

**El papel de las citocininas en el rompecabezas de la senescencia foliar  
durante el llenado de frutos en girasol (*Helianthus annuus* L.)**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,  
Área Ciencias Agrarias*

**Mariano Alejandro Mangieri**

Ingeniero Agrónomo Universidad de Buenos Aires -2011

Lugar de trabajo: IFEVA-CONICET



**FAUBA**

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



## **COMITÉ CONSEJERO**

Director de tesis

**Claudio Alejandro Chimenti**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae, Producción Vegetal (Universidad de Buenos Aires)

Codirector de tesis

**Antonio Juan Hall**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Ph.D. Biological Sciences (Macquarie University, Australia)

Consejero de Estudios

**Gustavo Gabriel Striker**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

## **JURADO DE TESIS**

**Irma Natalia Roberts**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

**Juan José Guiamet**

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Rosario)

Ph.D. Botany (University of Michigan, USA)

**Guillermo Aníbal Adrián Dosio**

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Magister Scientiae, Producción Vegetal (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Doctor. Desarrollo y adaptación de plantas (Universite Montpellier II)

Fecha de defensa de la tesis: 15 de Junio de 2018

## Dedicatoria

---

*Dedico mi tesis con todo mi amor a mi mujer y compañera de vida Elizabeth Ruth Navarro quién fue incondicional en todos estos años, sacrificando tiempo valioso, acompañándome los fines de semana en época de ensayo y apoyándome en casa con el largo proceso de escritura. A mi hijo Benicio, quien llegó a nuestras vidas un poco después de la mitad del doctorado, en el momento justo, permitiéndome con su alegría y su mirada llena de luz afrontar la etapa final de otra manera. A mi madre Antonina Josefa Prainito y a mi padre Antonio Rubén Mangieri quienes de manera incondicional me apoyaron y me supieron aconsejar en todo momento durante estos cinco años. A Diego Martín Mangieri, hermano y amigo quien en todo momento me alentó en este camino. A mi suegra Malena Gauna, quién siempre me animó a seguir adelante.*

## Agradecimientos

---

*Agradezco a Claudio A. Chimenti por la oportunidad de dirigirme y formarme. Claudio estuvo presente en todo momento a lo largo de estos cinco años y transmitió conocimientos y valores profundos que me acompañaran a lo largo de mi vida en la investigación. A mi codirector Antonio J. Hall quién siempre estuvo predispuesto al debate de los resultados. A mi consejero de estudios, Gustavo G. Striker quién también estuvo presente en todo momento orientándome en este camino. A Edmundo Ploschuk, quien con mucho entusiasmo y paciencia me capacitó en el uso del LI-6400. A Pedro Tognetti, a Adelia González Arzac y a Luis Perez, por sus consejos a la hora de encarar los análisis estadísticos y en la presentación de las figuras. A Roberto Tornese, Walter De Nicolás, Juan Carlos Villardi y Nicolás Franco, quienes fueron importantes en tareas a campo, y se transformaron en grandes amigos. Al FONCyT por la beca inicial de doctorado y al CONICET por la beca de finalización de doctorado. Al IFEVA por brindarme el lugar de trabajo tanto para la realización de los ensayos, como para trabajo de gabinete. Por último quiero agradecer a todos los amigos que me dejó el doctorado, que estuvieron presentes a lo largo de estos cinco años con un consejo, consulta, charla, debate, apoyo, o simplemente con un mate, a todos ellos muchas gracias.*

## Declaración

---

*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*

*Mangieri Mariano Alejandro*

## Publicaciones derivadas de la tesis

---

Mangieri, M. A., Hall, A. J., Striker, G. G., & Chimenti, C. A. (2017). Cytokinins: A key player in determining differences in patterns of canopy senescence in Stay-Green and Fast Dry-Down sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids. *European Journal of Agronomy*, 86, 60-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2017.03.007>

# INDICE GENERAL

<b>Resumen.....</b>	<b>xxi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xxii</b>
<b>Capítulo I.....</b>	<b>23</b>
<b>Introducción General.....</b>	<b>23</b>
1.1    Marco conceptual .....	24
1.2    El proceso de senescencia foliar.....	25
1.3    Citocininas: Reguladoras del proceso de senescencia foliar .....	25
1.4    El rol de las raíces .....	26
1.5    Justificación de la investigación.....	27
1.6    Objetivos e Hipótesis .....	28
1.6.1    Objetivo general .....	28
1.6.2    Objetivos específicos .....	28
1.7    Estructura de la tesis.....	29
<b>2    Capítulo II.....</b>	<b>30</b>
<b>Dinámica de la concentración de citocininas en hojas durante el llenado de frutos, y su asociación con la funcionalidad radical y la senescencia foliar.....</b>	<b>30</b>
2.1    Introducción .....	31
2.2    Materiales y métodos .....	32
2.2.1    Diseño experimental y condiciones de cultivo.....	32
2.2.2    Variables de respuesta.....	33
2.2.2.1    Densidad Longitudinal de Raíces Vivas (DLRV) .....	33
2.2.2.2    Índice de área foliar verde (IAFV) .....	34
2.2.2.3    Variables de hoja .....	34
2.2.2.3.1    Clorofila Total.....	34
2.2.2.3.2    Fotosíntesis neta y rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII).....	35
2.2.2.3.3    Concentración de trans-Zeatina en hojas .....	36
2.2.2.4    Intensidad y calidad de la luz incidente sobre las posiciones de hoja.....	36
2.2.3    Análisis estadístico.....	37
2.3    Resultados .....	37

2.3.1	Interacción Híbrido-Año .....	37
2.3.2	Densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) .....	38
2.3.3	Índice de área foliar verde (IAFV) .....	39
2.3.4	Dinámica de la concentración de clorofila total en hojas .....	40
2.3.5	Fotosíntesis Neta .....	41
2.3.6	Rendimiento cuántico del FOTOSISTEMA II (PSII) .....	42
2.3.7	Dinámica de la concentración de trans-Zeatina en hojas .....	43
2.3.8	Comparaciones de los momentos de cambios de pendiente ( <i>plateau</i> previo a la caída> fase de caída) de la dinámica de las variables de hoja.....	49
2.3.9	Intensidad y calidad de la luz incidente sobre las posiciones de hoja.....	50
2.4	Discusión .....	52
<b>3</b>	<b>Capítulo III .....</b>	<b>54</b>
	<b>Dinámica de la cantidad de citocininas en el fluido xilemático durante el llenado de los frutos, y umbral de citocininas foliares debajo del cual se desencadena la senescencia foliar .....</b>	<b>54</b>
3.1	Introducción .....	55
3.2	Materiales y métodos .....	56
3.2.1	Diseño experimental y condiciones de cultivo.....	56
3.2.2	Variables de respuesta.....	56
3.2.2.1	Densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) e índice de área foliar verde (IAFV) .....	56
3.2.2.2	Cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogidas en el período de observación bajo -100 kPa .....	56
3.2.2.3	Flujo de savia xilemática .....	57
3.2.2.4	Aplicaciones exógenas de citocininas.....	58
3.2.3	Análisis estadístico.....	58
3.3	Resultados .....	59
3.3.1	Interacción Híbrido-Año .....	59
3.3.2	Cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogidas en el período de observación bajo -100 kPa .....	59
3.3.3	Densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) e índice de área foliar verde (IAFV).....	61
3.3.4	Flujo de savia xilemática.....	61
3.3.5	Respuesta a las aplicaciones exógenas de citocininas.....	62



3.4	Discusión .....	66
<b>4</b>	<b>Capítulo IV .....</b>	<b>69</b>
	<b>Efecto de la alteración en la partición de los hidratos de carbono entre los órganos de la planta sobre la senescencia foliar .....</b>	<b>69</b>
4.1	Introducción .....	70
4.2	Materiales y Métodos .....	71
4.2.1	Diseño experimental y condiciones de cultivo.....	71
4.2.2	Variables de respuesta.....	71
4.2.3	Análisis estadístico.....	72
4.3	Resultados .....	72
4.3.1	Interacción Híbrido-Tratamiento-Año .....	72
4.3.2	Densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) .....	73
4.3.3	Cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogidas en el período de observación .....	78
4.3.4	Índice de área foliar verde (IAFV).....	80
4.3.5	Dinámica de la concentración de clorofila total en hojas .....	82
4.3.6	Fotosíntesis Neta .....	83
4.3.7	Rendimiento cuántico del PSII .....	84
4.3.8	Dinámica de la concentración de trans-Zeatina en hojas .....	84
4.4	Discusión .....	91
<b>5</b>	<b>Capítulo V .....</b>	<b>94</b>
	<b>Discusión general y conclusiones .....</b>	<b>94</b>
5.1	Introducción .....	95
5.2	Evaluación del logro de objetivos y de la validación de hipótesis propuestos para la tesis .....	96
5.3	Conclusión.....	99
5.4	Vista prospectiva .....	102
<b>6</b>	<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>Apéndice I .....</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>Apéndice II .....</b>	<b>121</b>
<b>9</b>	<b>Apéndice III.....</b>	<b>123</b>

## INDICE DE CUADROS

**Cuadro 2.1.** Momento en el cual ocurre el cambio de fase (*plateau* previo a la caída > fase de caída) en la evolución de la dinámica de la clorofila total, de la fotosíntesis neta, del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) y de la concentración de trans-zeatina en las cinco posiciones de hoja estudiadas (17, 20, 22, 24 y 27) en un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG). Cada valor corresponde al tiempo térmico (TT) [ $T_b=4^{\circ}\text{C}$ , Villalobos y Ritchie (1992)] acumulado desde la finalización de la expansión de la hoja, y es promedio de cinco observaciones ( $n = 5$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) dentro de cada combinación híbrido x posición de hoja (filas del cuadro). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre híbridos para cada posición de hoja. Datos correspondientes al Año 1.

**Cuadro 2.2.** Valores de radiación fotosintéticamente activa (PAR) (A) y de la relación Rojo/Rojo Lejano (B), sobre el canopeo y en cada una de las cinco posiciones de hoja estudiadas en un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG), medidos 1, 12, 22 y 30 días después del inicio de la antesis (DDIA), estadios R5, R6, R7 y R8, respectivamente. Cada valor corresponde al promedio de cinco observaciones ( $n = 5$ ). Los momentos de inicio de la senescencia foliar para cada posición fueron: híbrido FDD, hojas de las posiciones 17 (14 DDIA), 20 (18 DDIA), 22 (23 DDIA) y 24 (28 DDIA); híbrido SG, hojas de las posiciones 17 (17 DDIA), 20 (24 DDIA), 22 (27 DDIA) y 24 (35 DDIA). En cada variable, letras minúsculas diferentes en cada momento de observación indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los híbridos para cada posición de hoja, y entre posiciones de hoja dentro de cada híbrido. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los 4 momentos de observación, para cada combinación híbrido x posición de hoja (filas del cuadro). Datos correspondientes al Año 1.

**Cuadro 3.1.** Volumen recogido y concentración de citocinina total en cada momento de observación expresado en días desde el inicio de antesis (DDIA) para un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG). Cada valor corresponde al promedio de cinco observaciones ( $n = 5$ ). Dentro de cada variable, letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre híbridos y momentos de medición. Datos correspondientes al Año 1.

**Cuadro 3.2.** Relación entre la concentración de citocinina total y la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) en cada momento de observación, expresado en días desde el inicio de antesis (DDIA) para un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG). Cada valor corresponde al promedio de cinco observaciones ( $n = 5$ ). Resaltado en gris se encuentran aquellos momentos y valores para los cuales no se contaba con una observación de DLRV y se utilizó las funciones ajustadas (FDD:  $Y = 0,3434 + [0,004456 \cdot X]$ ; SG:  $Y = 0,4187 + [0,004692 \cdot X]$ ) para estimarlos. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre híbridos y momentos de medición. Se encuentran excluidos del análisis los momentos para los cuales los valores fueron estimados. Datos correspondientes al Año 1.

**Cuadro 4.1.** Volumen recogido y concentración de citocinina total en cada momento de observación expresado en días desde el inicio de antesis (DDIA) para el tratamiento control (C) y desgranado (-F), en un híbrido fast dry down (FDD, A) y otro stay green (SG, B). Cada valor corresponde al promedio de cinco observaciones ( $n=5$ ). En cada

variable, letras diferentes dentro de cada híbrido indican diferencias significativas entre tratamientos y momentos de medición ( $p < 0.05$ ). Datos correspondientes al Año 1.

**Cuadro 4.2.** Momento en el cual ocurre el cambio de fase (*plateau* previo a la caída > fase de caída) en la evolución de la clorofila total, de la fotosíntesis neta, del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) y de la concentración de trans-zeatina en las distintas posiciones de hoja en un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG) en el tratamiento desgranado (-F). Cada valor corresponde al tiempo térmico (TT) [ $T_b=4^\circ\text{C}$ , Villalobos y Ritchie (1992)] acumulado desde la finalización de la expansión de la hoja, y es promedio de cinco observaciones ( $n = 5$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) dentro de cada combinación híbrido x posición de hoja (filas del cuadro). Datos correspondientes al Año 1.

**Cuadro A1.1.** Valores p resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efecto de los factores híbrido (H) y año (A) y su interacción sobre los parámetros (ordenada al origen, pendiente de la fase inicial, momento de cambio entre las fases y pendiente de la segunda fase) de las funciones bi-lineales ajustadas a la dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) y el índice de área foliar verde (IAFV) ( $n=5$ ). La interacción H x A no se muestra debido a que no fue significativa ( $p > 0.05$ ) en ningún caso (ns: no significativo  $p > 0.05$ ).

**Cuadro A1.2.** Valores p resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efecto de los factores híbrido (H), posición de la hoja (P), año (A) y sus interacciones sobre los parámetros (ordenada al origen, pendiente de la fase inicial, momento de cambio entre las fases y pendiente de la segunda fase) de las funciones bi-lineales ajustadas a la dinámica de la clorofila total, de la fotosíntesis neta, del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) y de la trans-Zeatina ( $n=5$ ). Las interacciones H x A, P x A y H x P x A no se muestran debido a que no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) en ningún caso (ns: no significativo  $p > 0.05$ ).

**Cuadro A1.3.** Contraste entre años para las funciones ajustadas a la dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) (a), del índice de área foliar verde (IAFV) (b), y de los indicadores de funcionalidad foliar: concentración de clorofila total (c), fotosíntesis neta (d), rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) (e) y concentración de trans-Zeatina (f), para las posiciones foliares 17, 20, 22, 24 y 27 en un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG). Se muestran los valores de los cuatro parámetros de las funciones bi-lineales (ordenada al origen, pendiente de la fase inicial, momento de cambio entre las fases y pendiente de la segunda fase), ajustadas a cada relación variable/Momento en los dos años ( $n = 5$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre años, y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre híbridos en cada posición foliar. Las mediciones se tomaron desde el principio de antesis, hasta algunos días después de la madurez fisiológica. DDIA significa "días desde el inicio de antesis", y "TT ( $^\circ\text{C día}$ ,  $T_b=4^\circ\text{C}$ )" Tiempo térmico desde que la máxima expansión de las hojas fue alcanzada en cada posición.

**Cuadro A1.4.** Valores p resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efecto de los factores híbrido (H), estadio fenológico de medición (S), posición de la hoja (P), año (A) y sus interacciones sobre la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y la relación rojo/rojo lejano. Las interacciones H x S, H x A, S x A, P x A, H x S x P, H x S x A, H x P x A, S x P x A, H x S x P x A no se muestran debido a que no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) en ningún caso (ns: no significativo,  $p > 0.05$ ).

**Cuadro A2.1.** Valores *p* resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efectos de los factores híbrido (H), estadío fenológico de medición (S), año (A) y sus interacciones sobre la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogidas en el período de observación. Las interacciones H x A, S x A, H x S x A no se muestran debido a que no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) en ningún caso (ns: no significativo,  $p > 0.05$ ).

**Cuadro A3.1.** Valores *p* resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efecto de los factores híbrido (H), tratamiento desgranado (T) y año (A) y sus interacciones sobre los parámetros (ordenada al origen, pendiente de la fase inicial, momento de cambio entre las fases y pendiente de la segunda fase) de las funciones bi-lineales ajustadas a la dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) y el índice de área foliar verde (IAFV) ( $n = 5$ ). Las interacciones H x A, T x A, H x T x A no se muestran debido a que no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) en ningún caso (ns: no significativo,  $p > 0.05$ ).

**Cuadro A3.2.** Valores *p* resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efecto de los factores híbrido (H), tratamiento desgranado (T), estadío fenológico de medición (S), año (A) y sus interacciones sobre la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogidas en el período de observación. Las interacciones H x A, T x A, S x A, H x T x A, H x S x A, T x S x A, H x T x S x A no se muestran debido a que no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) en ningún caso (ns: no significativo,  $p > 0.05$ ).

**Cuadro A3.3.** Valores *p* resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efecto de los factores híbrido (H), tratamiento desgranado (T), posición de la hoja (P), año (A) y sus interacciones sobre los parámetros (ordenada al origen, pendiente de la fase inicial, momento de cambio entre las fases y pendiente de la segunda fase) de las funciones bi-lineales ajustadas a la dinámica de la clorofila total, la fotosíntesis neta, rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) y la trans-Zeatina ( $n=5$ ). Las interacciones H x A, T x A, P x A, H x T x A, H x P x A, T x P x A, H x T x P x A no se muestran debido a que no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) en ningún caso (ns: no significativo,  $p > 0.05$ ).

**Cuadro A3.4.** Contraste entre años para las funciones ajustadas a la dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) (a), del índice de área foliar verde (IAFV) (b), y de los indicadores de funcionalidad foliar: concentración de clorofila total (c), fotosíntesis neta (d), rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) (e) y concentración de trans-Zeatina (f), para las posiciones foliares 17, 20, 22, 24 y 27, los tratamientos control (C) y desgranado (-F), en un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG). Se muestran los valores de los cuatro parámetros de las funciones bi-lineales (ordenada al origen, pendiente de la fase inicial, momento de cambio entre las fases y la pendiente de la segunda fase), ajustadas a cada relación variable/momento en los dos años ( $n = 5$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre años, y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos C y -F para cada combinación híbrido por posición de la hoja. Las mediciones se tomaron desde el principio de antesis, hasta algunos días después de la madurez fisiológica. DDIA significa "días desde el inicio de antesis", y "TT ( $^{\circ}\text{C día}$ ,  $T_b=4^{\circ}\text{C}$ )" Tiempo térmico desde que la máxima expansión de las hojas fue alcanzada en cada posición.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Fig. 2.1.** Diagrama de ubicación en la hoja de las posiciones utilizadas para las mediciones del SPAD.

**Fig. 2.2.** Dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV), en el estrato de suelo de 0-60 cm para los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD) durante el llenado de frutos. Las flechas verticales continuas y discontinuas con trazo amplio y cerca de las funciones ajustadas, indican el tiempo en el que los híbridos SG y FDD, respectivamente, alcanzaron los picos de valores máximos de DLRV. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (gris continua), R6 (gris discontinua) y R9 (negra continua). Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.

**Fig. 2.3.** Dinámica del índice de área foliar verde (IAFV), para los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD) durante el llenado de frutos. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el tiempo de inicio de la caída de IAFV en SG y FDD, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (gris discontinua), R6 (gris continua), y R9 (negra continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las flechas grises continuas de trazo estrecho cercanas a las funciones ajustadas para cada híbrido, indican el inicio de la senescencia de la hoja cuyas posiciones se indica. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.

**Fig. 2.4.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta ( $P_n$ ) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D) en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 17, en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD). Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en SG y FDD, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.

**Fig. 2.5.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta ( $P_n$ ) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D) en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 20, en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD). Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en SG y

FDD, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.

**Fig. 2.6.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D) en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 22, en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD). Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en SG y FDD, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.

**Fig. 2.7.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D) en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 24, en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD). Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en SG y FDD, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.

**Fig. 2.8.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) (D) en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 27, en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD). Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en SG y FDD, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.



**Fig. 3.1.** Dinámica de la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogido en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD) durante el llenado de frutos. Las flechas indican los estadios fenológicos de R5.1 (gris discontinua), R6 (gris continua) y R8 (negra continua). Las líneas verticales negras continuas y discontinuas coronadas indican el comienzo de la caída en la DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las líneas coronadas asociadas a cada barra indican  $\pm 1$  E. S. ( $n=5$ ). Letras diferentes, por encima de cada barra, indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre híbridos y días desde inicio de antesis. Datos correspondientes al Año 1.

**Fig. 3.2.** Dinámicas de la evapotranspiración de referencia ( $ET_0$ ) y del flujo de savia en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD), durante el llenado de frutos. Las flechas cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (gris discontinua), R6 (gris continua), y R9 (negra continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Cada valor de flujo de savia representa el promedio de las cinco parcelas ( $n = 5$ ). La evapotranspiración de referencia fue estimada con la ecuación de Hargreaves et al. (1985). Datos correspondientes al Año 1.

**Fig. 3.3.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina en la hoja 17 en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja, y en respuesta a aplicaciones exógenas de 8 ppm de soluciones de BAP y de trans-Zeatina en los híbridos fast dry down (A) y stay green (B). La flecha continua cercana a la curva indica el momento de inicio de la caída de la concentración de clorofila total del tratamiento control. Las flechas discontinuas cercanas a la curva indican los momentos de aplicación. Las flechas pequeñas cercanas al eje "x" indican el momento de ocurrencia del estadio R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Datos correspondientes al Año 1.

**Fig. 3.4.** Dinámica de la concentración de clorofila total (A, B), de la fotosíntesis neta ( $P_n$ ) (C, D) y del rendimiento cuántico máximo de PSII ( $F_v/F_m$ ) (E, F) en la hoja 17, en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja, y en respuesta a aplicaciones exógenas de 8 ppm de soluciones de BAP y de trans-Zeatina, en los híbridos fast dry down (A, C, E) y stay green (B, D, F). La flecha continua cercana a la curva indica el momento de inicio de la caída de la concentración de clorofila total del tratamiento control. Las flechas discontinuas cercanas a la curva indican los momentos de aplicación. Las flechas pequeñas cercanas al eje "x" indican el momento de ocurrencia del estadio R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Datos correspondientes al Año 1.

**Fig. 4.1.** Dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) en el estrato de 0-60 cm del suelo, en los híbridos fast fry down (FDD, A) y stay green (SG, B) durante el llenado de frutos, para los tratamientos control (C) y desgranado (–F). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Las flechas verticales continuas y discontinuas con trazo amplio y cerca de las funciones ajustadas, indican el tiempo en el que los tratamientos –F y C, respectivamente, alcanzaron los picos de valores máximos de DLRV. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (gris continua), R6 (gris discontinua) y R9 (negra continua). Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III.

**Fig. 4.2.** Imágenes de las raíces obtenidas en el tratamiento control del híbrido fast dry down, a los 0 (A), 3 (B), 6 (C), 9 (D) y 12 (E) días desde el inicio de antesis para las profundidades 0-60 cm (1), 60-120 cm (2) y 120-170 cm (3). Recuadros rojos indican el momento de inicio de la senescencia radical. Imágenes correspondientes al año 1.

**Fig. 4.3.** Imágenes de las raíces obtenidas en el tratamiento control del híbrido stay green, a los 0 (A), 3 (B), 6 (C), 9 (D), 12 (E), 15 (F) y 18 (G) días desde el inicio de antesis, para las profundidades 0-60 cm (1), 60-120 cm (2) y 120-170 cm (3). Recuadros rojos indican el momento de inicio de la senescencia radical. Imágenes correspondientes al Año 1.

**Fig. 4.4.** Imágenes de las raíces obtenidas en el tratamiento desgranado del híbrido fast dry down, a los 0 (A), 5 (B), 12 (C), 17 (D), 22 (E), 28 (F), 33 (G), 38 (H), 43 (I), 48 (J), 52 (K), 58 (L), 63 (M), 67 (N), 75 (Ñ), 79 (O), 80 (P) y 84 (Q) días desde el inicio de antesis, para las profundidades 0-60 cm (1), 60-120 cm (2) y 120-170 cm (3). Imágenes correspondientes al Año 1.

**Fig. 4.5.** Imágenes de las raíces obtenidas en el tratamiento desgranado del híbrido stay green, a los 0 (A), 5 (B), 12 (C), 17 (D), 22 (E), 28 (F), 33 (G), 38 (H), 43 (I), 48 (J), 52 (K), 58 (L), 63 (M), 67 (N), 75 (Ñ), 79 (O), 80 (P) y 84 (Q) días desde el inicio de antesis, para las profundidades 0-60 cm (1), 60-120 cm (2) y 120-170 cm (3). Imágenes correspondientes al Año 1.

**Fig. 4.6.** Dinámica de la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogido en los híbridos fast dry down (FDD, A) y stay green (SG, B) para los tratamientos control (C) y desgranado (-F) durante el llenado de frutos. La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo III. Las flechas indican los estadios fenológicos R5.1 (gris discontinua), R6 (gris continua) y R8 (negra continua). Las líneas verticales negras continuas y discontinuas coronadas indican el comienzo de la caída en la DLRV en -F y C, respectivamente. Las líneas coronadas asociadas a cada barra indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Letras diferentes, por encima de cada barra, indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos (C y -F) y días desde inicio de antesis, para cada híbrido. Datos correspondientes al Año 1.

**Fig. 4.7.** Dinámica del índice de área foliar verde (IAFV), para los híbridos FDD (A) y SG (B) para los tratamientos de control (C) y desgranado (-F), durante el llenado de frutos. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el tiempo de inicio de la caída de IAFV en -F y C, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (gris discontinua), R6 (gris continua), y R9 (negra continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en la DLRV en -F y C, respectivamente. Las flechas grises continuas de trazo estrecho, cercanas a las funciones ajustadas para cada híbrido, indican el inicio de la senescencia de la hoja cuya posición se indica. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III. Datos correspondientes al Año 1.

**Fig. 4.8.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D), en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la



posición 17, en los híbridos fast dry down (FDD, A, C, E, G) y stay green (SG, B, D, F, H) para los tratamientos control (C) y desgranado (-F). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en -F y C, respectivamente. Las flechas discontinuas y continuas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 y R9, respectivamente. Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cerca del eje "x" indican el comienzo de la caída de la DLRV en -F y C, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III. Datos correspondientes al año 1.

**Fig. 4.9.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D), en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 20, en los híbridos fast dry down (FDD, A, C, E, G) y stay green (SG, B, D, F, H) para los tratamientos control (C) y desgranado (-F). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en -F y C, respectivamente. Las flechas discontinuas y continuas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 y R9, respectivamente. Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cerca del eje "x" indican el comienzo de la caída de la DLRV en -F y C, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III. Datos correspondientes al año 1.

**Fig. 4.10.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D), en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 22, en los híbridos fast dry down (FDD, A, C, E, G) y stay green (SG, B, D, F, H) para los tratamientos control (C) y desgranado (-F). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en -F y C, respectivamente. Las flechas discontinuas y continuas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 y R9, respectivamente. Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cerca del eje "x" indican el comienzo de la caída de la DLRV en -F y C, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III. Datos correspondientes al año 1.

**Fig. 4.11.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D), en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 24, en los híbridos fast dry down (FDD, A, C, E, G) y stay green (SG, B, D, F, H) para los tratamientos control (C) y desgranado (-F). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas,

cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en -F y C, respectivamente. Las flechas discontinuas y continuas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 y R9, respectivamente. Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cerca del eje "x" indican el comienzo de la caída de la DLRV en -F y C, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III. Datos correspondientes al año 1.

**Fig. 4.12.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D), en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 27, en los híbridos fast dry down (FDD, A, C, E, G) y stay green (SG, B, D, F, H) para los tratamientos control (C) y desgranado (-F). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en -F y C, respectivamente. Las flechas discontinuas y continuas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 y R9, respectivamente. Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cerca del eje "x" indican el comienzo de la caída de la DLRV en -F y C, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III. Datos correspondientes al año 1.

**Fig. 5.1.** Esquema integrativo de los resultados. En la parte superior se encuentran los factores que afectan la senescencia foliar (flechas negras hacia el proceso), y en la parte inferior, el modelo que se desprende a partir de la presente tesis centrada en el papel de las citocininas. Dentro del mismo los conjuntos en la columna izquierda indican la situación de planta intacta, y en la derecha la situación de desgrane. En el modelo las flechas rojas indica efecto sobre, y las flechas negras si dicho efecto es positivo (hacia arriba), negativo (hacia abajo) o neutro (signo =).

**Fig. A.1.1.** Dinámica de la temperatura media diaria (A) y de la radiación fotosintéticamente activa (PAR, B), en función de los días desde la siembra para los años 1 y 2 de experimentación. Las flechas (Año 1) y las líneas (Año 2) próximas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (continuas) y de R9 (discontinuas), para los híbridos fast dry down (negras) y stay green (grises).

**Fig. A.2.1.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina en la hoja 17 en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja, y en respuesta a aplicaciones exógenas de 8 ppm de soluciones de BAP y de trans-Zeatina en los híbridos fast dry down (A) y stay green (B). La flecha continua cercana a la curva indica el momento de inicio de la caída de la concentración de clorofila total del tratamiento control. Las flechas discontinuas cercanas a la curva indican los momentos de aplicación. Las flechas pequeñas cercanas al eje "x" indican el momento de ocurrencia del estadio R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Datos correspondientes al Año 2.

**Fig. A.2.2.** Dinámica de la concentración de clorofila total (A, B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C, D) y del rendimiento cuántico máximo de PSII ( $F_v/F_m$ ) (E, F) en la hoja 17,

en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja, y en respuesta a aplicaciones exógenas de 8 ppm de soluciones de BAP y de trans-Zeatina, en los híbridos fast dry down (A, C, E) y stay green (B, D, F). La flecha continua cercana a la curva indica el momento de inicio de la caída de la concentración de clorofila total del tratamiento control. Las flechas discontinuas cercanas a la curva indican los momentos de aplicación. Las flechas pequeñas cercanas al eje "x" indican el momento de ocurrencia del estadio R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Datos correspondientes al Año 2.

**Fig. A.3.1.** Diagrama de un tubo minirhizotron instalado debajo de una hilera (adaptado de Lisanti et al. 2013).

## ABREVIATURAS

---

ANOVA: Análisis de la varianza

BAP: 6- bencilaminopurina

°C: Grados centígrados

Chl: Clorofila

DDIA: Días desde el inicio de antesis

DLRV: Densidad longitudinal de raíces vivas/ LRLD: Live root length density

dpi: Dots per inch/Puntos por pulgada

-F: Desgranado

FDD: Fast dry down/ Senescencia precoz

$F_v/F_m$ : Rendimiento cuántico máximo de PSII

IAFV: Índice de área foliar verde

PAR: Photosynthetically active radiation/Radiación fotosintéticamente activa

Pn: Fotosíntesis neta

PPFD: Photosynthetic photon flux density/Densidad de flujo de fotones

PSII: FOTOSISTEMA II.

R/RL: Relación rojo/ rojo lejano

S: Sur

SG: Stay green

Tb: Temperatura base

TTC: Trifenil tetrazolio cloruro

TT: Tiempo térmico

v/v: volume/volumen

W: West/oeste

w/v: Weight/volume, peso/volumen

ZT: trans-Zeatina

Z: Zeatina

## Resumen

---

### **El papel de las citocininas en el rompecabezas de la senescencia foliar durante el llenado de frutos en girasol (*Helianthus annuus* L.)**

El objetivo de esta tesis fue estudiar la senescencia foliar durante el período de llenado de los frutos en girasol, poniendo especial atención en el papel que cumplen las citocininas en el mismo. Se utilizaron para ello dos híbridos con diferentes patrones de senescencia de canopeo, acelerada (fast dry down [FDD]) y demorada (stay green [SG]). Se realizó un seguimiento de las dinámicas de la concentración de citocininas foliares y en el flujo xilemático, y sus asociaciones con las dinámicas de senescencia radical y foliar. Además, se estudiaron los efectos de la reducción del número de frutos en crecimiento sobre los procesos de senescencia foliar y radical; y mediante aplicaciones exógenas de citocininas se estableció el umbral mínimo de citocininas foliares por debajo del cual se desencadena la senescencia foliar. Los resultados ratifican que las raíces comienzan a “senescer” antes que el canopeo y establecen la consistencia de la relación entre la dinámica post-antesis de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) y la de la concentración de citocininas en el fluido xilemático. Además establecen una asociación positiva entre las dinámicas de las concentraciones de citocininas en el fluido xilemático y la de las hojas, y demuestran que las dinámicas de los indicadores de la funcionalidad foliar (nivel de clorofila, tasa fotosintética, rendimiento cuántico máximo del PSII) se asocian positivamente con la de la trans-Zeatina foliar. Por último prueban que los cambios en la partición de los hidratos de carbono a favor de las raíces retrasan el inicio de las senescencias radical y foliar, y confirman la existencia de un umbral de citocininas a nivel foliar por debajo del cual se desencadena el proceso de senescencia foliar. Estos son los primeros resultados que muestran asociaciones positivas entre la DLRV, las concentraciones de citocininas a nivel de fluido xilemático y foliar, y los indicadores de la funcionalidad foliar. Además, es el primer estudio que establece el umbral de citocininas foliares por debajo del cual se inicia la senescencia foliar.

*Palabras claves:* Senescencia Foliar, Híbridos de patrones de senescencia contrastante, Período de llenado de frutos, Dinámica de citocininas foliares, Dinámica de citocininas en savia xilemática, Umbral de citocininas que dispara la senescencia, Dinámica de la senescencia del sistema radical, Cambios en la relación fuente/destino.

## Abstract

---

### **The role of cytokinins in the puzzle of leaf senescence during fruit filling in sunflower (*Helianthus annuus* L.)**

The aim of this thesis was to study, during fruits filling in sunflower, the process of leaf senescence focusing mainly on the role of the cytokinins. Two hybrids with different canopy senescence patterns, accelerated (fast dry down [FDD]) and delayed (stay green [SG]), were used. The dynamics of leaf cytokinin concentration and cytokinins in the xylem sap, and their associations with root and leaf senescence dynamics were monitored. In addition, the effects of reducing the number of growing fruits on the processes of leaf and root senescence were studied; and by means of exogenous applications of cytokinins, a minimum threshold of foliar cytokinins below which foliar senescence begins was established. The results confirm that the onset of root senescence precedes that of canopy senescence; establish the consistency between the dynamics of post-anthesis live root length density (LRLD) and the cytokinin concentration in the xylem sap; establish a positive association between the dynamics of cytokinin concentrations in the xylem sap and leaf cytokinin concentrations; show that the dynamics of leaf functionality indicators (chlorophyll level, photosynthetic rate, quantum yield of PSII) are positively associated with that of leaf trans-Zeatin; show that changes in the partitioning of carbohydrates in favor of roots delay the onset of root and leaf senescence, and confirm the existence of a cytokinin threshold at leaf level below which the leaf senescence process is triggered. These are the first results that show positive associations between DLRV, cytokinin concentrations in xylem sap and at leaf level, and the indicators of leaf functionality. In addition, it is the first study to establish the foliar cytokinin threshold below which leaf senescence commences.

**Keywords:** Leaf senescence, Hybrids of contrasting senescence patterns, Fruit filling phase, Leaf cytokinin dynamics, Xylem sap cytokinin dynamics, Cytokinin threshold that triggers leaf senescence, Dynamics of root system senescence, Changes in source/sink ratio.

# **Capítulo I**

## **Introducción General**

## Capítulo I

### Introducción General

#### 1.1 Marco conceptual

El rendimiento en grano de un cultivo, se puede considerar como el producto entre el número de granos por unidad de superficie y el peso promedio de los mismos. Estos componentes del rendimiento son generados durante distintas etapas, parcialmente superpuestas, del ciclo ontogénico. En girasol (*Helianthus annuus* L.) el número de granos es determinado durante las etapas de diferenciación floral y floración (Cantagallo y Hall 2002), mientras que el peso de los granos está fuertemente influido por las condiciones de crecimiento desde post floración hasta madurez fisiológica. Sin embargo puede también haber efectos derivados del crecimiento del ovario durante la fase pre-antesis (Cantagallo et al., 2004; Lindstrom et al., 2006).

Tanto en cultivos invernales, como cebada (*Hordeum vulgare* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) (Gregersen et al., 2008), y en cultivos de verano, como maíz (*Zea mays* L.) (Rajcan et al., 1999; Rajcan y Tollenaar, 1999a), se ha encontrado que la senescencia foliar durante el llenado del grano reduce el rendimiento de estos cultivos limitados por fuente. Esto se debe a la disminución de la asimilación del carbono, algo que afecta la biomasa particionada a los granos.

En especies monocárpicas, la senescencia foliar está coordinada con la senescencia de la planta entera e influenciada por factores endógenos y exógenos. La regulación de este proceso fisiológico no sigue una simple cadena de transducción de señales, sino que influyen en él una red de señales internas y externas (He et al., 2001; Gan y Amasino, 1997; Buchanan-Wollaston et al., 2003). Dentro de las señales externas se encuentran factores de estrés tales como la sequía (Pic et al., 2002) y cambios en la calidad e intensidad de la luz (Guamet et al., 1989; Rousseaux et al., 1996; 2000). Entre las señales internas las fitohormonas (Noodén et al., 1997), la funcionalidad de la raíz (Lisanti et al., 2013), y la demanda de nitrógeno por otros órganos, especialmente los granos (Sinclair y de Wit, 1976; Sinclair y Horie, 1989; Van Oosterom et al., 2010), pueden tener un papel importante en la inducción de la senescencia foliar. Entre las hormonas involucradas en el retraso de dicho proceso, se incluyen las citocininas, las auxinas y el ácido giberélico. Por el contrario, el etileno, el ácido abscísico, el ácido jásmonico y el ácido salicílico promueven la senescencia foliar (Lim et al., 2007). Los cambios en el metabolismo o efectos de las relaciones fuente/destino de fotoasimilados también desempeñan funciones importantes en la inducción de la senescencia (Noodén et al., 1997). Los resultados de Wiedemuth et al. (2005) en hojas de cebada, indican un aumento en los contenidos totales de carbono y de nitrógeno durante el crecimiento de las hojas, y una disminución de ambos durante la senescencia. Borrell et al. (2001) encontraron en sorgo (*Sorghum bicolor* L.) que los híbridos con carácter stay – green (SG) siguen acumulando nitrógeno en etapas avanzadas del llenado de granos y que las hojas tienen mayor nitrógeno foliar específico que los híbridos de tipo de senescencia fast dry down, (FDD). Además, hipotetizan que ese comportamiento es producto de la mayor supervivencia de raíces gracias a un mayor aporte de carbohidratos a la raíz.



## 1.2 El proceso de senescencia foliar

La senescencia foliar se produce de manera coordinada a nivel de toda la hoja, desde la punta del ápice y los márgenes hacia la base de la hoja, siendo las nervaduras los últimos tejidos en “senescer”. En plantas anuales, la fuerte competencia de recursos por parte de los frutos y semillas, da lugar al incremento de la senescencia secuencial, que se refiere a la competencia por los recursos entre las hojas de posiciones inferiores o antiguas y las de posiciones superiores o nuevas (Guiboileau et al., 2010). Neumann y Stein (1984) han demostrado que previo a la senescencia, se produce una disminución en el flujo de la savia del xilema a las hojas. En maíz, la iniciación de la senescencia ocurrió alrededor de 400-450 °C días desde la siembra, independientemente del ambiente de crecimiento percibido por las plantas (Borras et al., 2003). En soja (*Glycine max* L.) los cambios en la relación rojo/rojo lejano (R/RL) en el canopeo juegan un rol importante en la modulación de la senescencia foliar progresiva (Guamet et al., 1989). Estudios realizados en hojas de posiciones basales en girasol, demostraron que tanto la disminución de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) como de la relación rojo/rojo lejano (R/RL) promueven la senescencia (Rousseaux et al., 1996). Investigaciones posteriores concluyeron que el aumento de la relación R/RL puede retrasar la senescencia foliar de estas hojas (Rousseaux et al. 2000).

Durante el proceso de senescencia de las hojas se produce la degradación de los cloroplastos, el catabolismo de la clorofila y de macromoléculas tales como proteínas (Lamattina et al., 1985; Martínez et al., 2008), ácidos nucleicos y lípidos de membrana. Esto da lugar a la movilización del contenido de nitrógeno de las proteínas fotosintéticas y de sustancias orgánicas e inorgánicas hacia otros órganos en crecimiento (Lim et al., 2007).

## 1.3 Citocininas: Reguladoras del proceso de senescencia foliar

Las citocininas regulan diversos aspectos del crecimiento de las plantas y el desarrollo, incluyendo la senescencia foliar (Lim et al., 2007). También regulan la diferenciación vascular (Nieminen et al., 2008; Matsumoto-Kitano et al., 2008), la función de los meristemas (Letham et al., 1994), el desarrollo del cloroplasto (Zubo et al., 2008), la nodulación (Lohar et al., 2004; Gonzalez-Rizzo et al., 2006), la respuesta a estreses bióticos y abióticos (Argueso et al., 2009), y podrían desempeñar un papel importante en la regulación de las relaciones fuente-destino (Werner y Schmülling, 2009). La zeatina es la citocinina más abundante y es una de las citocininas dominantes en el control de la senescencia foliar (Noodén et al., 1990; Takei et al., 2001; Sakakibara 2006). En las plantas superiores la zeatina está presente en la forma trans y en la forma cis, y las mismas se pueden interconvertir por una enzima conocida como zeatina isomerasa (Armstrong, 1994). La forma trans es la más activa en ensayos biológicos (Schmitz et al., 1972). Los principales sitios de síntesis de citocininas libres en las plantas enteras son los meristemas apicales de la raíz (Akiyoshi et al., 1983; Akiyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984; Beveridge et al., 1997; Samuelson et al., 1992; Takei et al., 2001; White et al., 1934). Las citocininas sintetizadas en las raíces se mueven a través del xilema junto con el agua y los minerales absorbidos por las raíces. En el exudado del xilema, las citocininas también se encuentran en la forma de ribósidos de zeatina (Takei et al., 2001). Los ribósidos de zeatina, de dihidrozeatina, la zeatina y la dihidrozeatina

constituyeron la fracción más importante de citocininas en el exudado xilemático de soja (Noodén et al. 1990) aunque no se descartó la presencia de otra no identificada. En sorgo, Ambler et al. (1992) demostraron que las concentraciones de citocininas en la savia del xilema eran mayores en un genotipo de senescencia demorada.

Los resultados de Balibrea Lara et al. (2004), en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), indican que las citocininas regularían la senescencia mediante el control de la actividad de la invertasa extracelular. Esta enzima, regula la relación fuente- destino por hidrólisis de la sacarosa a hexosa, que es transportada a las células. La concentración de citocininas disminuyó en hojas senescentes de tabaco (Gan and Amasino 1995; Singh et al. 1992, Ori et al. 1999), lechuga (McCabe et al. 2001), *Phragmites australis* (Conrad et al. 2015), arroz (Liu et al. 2016), maíz (Ren et al. 2016), *Xanthium* (Richmond and Lang 1957), soja (Noodén et al. 1979) y *Arabidopsis thaliana* L. (Masferrer et al. 2002). Esta disminución fue propuesta como una señal clave del comienzo de la senescencia. Análisis moleculares en hojas senescentes de *Arabidopsis* revelaron que los genes implicados en la síntesis de citocininas - citocinina sintasa y la adenosina fosfato isopentenyl- transferasa (IPT)-, son reprimidos, mientras que un gen para la degradación de citocininas -citocinina oxidasa- es estimulado (Buchanan-Wollaston et al., 2005). La reducción del flujo de citocininas desde las raíces (medido desde 1 semana antes de la floración hasta madurez fisiológica), cumpliría un rol importante en el inicio de la senescencia monocarpica en soja, y dicha reducción parece estar inducida por mensajes provenientes de las vainas (Noodén et al., 1990).

## 1.4 El rol de las raíces

En diferentes cultivos (Gregory et al., 1978, trigo; Mengel y Barber, 1974, maíz; Sadras et al., 1989, girasol) se ha encontrado que la máxima acumulación de biomasa radical se alcanzó en la etapa de floración, y que posteriormente a esta etapa se produce la declinación de la misma. Lo mismo ocurre con la dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV). Durante la etapa de llenado de frutos en girasol, se produce una disminución significativa de la biomasa radical y de la DLRV, efectos asociados a la reducción del volumen de agua absorbida por el cultivo (Lisanti et al. 2013). Esta etapa es crítica porque en ella se define el peso seco de los frutos, uno de los componentes del rendimiento. A pesar de ello, hay muy poca información que detalle la dinámica de las raíces vivas del sistema radical y si eventualmente existe una asociación entre las modificaciones que en ella se producen y la senescencia de la parte aérea.

En girasol (de la Vega et al., 2011), al igual que en otras especies como maíz (Acciaresi et al., 2014; Antonietta et al., 2014), sorgo (Borrell et al., 2001), y trigo (Lopes y Reynolds, 2012), se ha demostrado la existencia de variabilidad en los patrones de senescencia foliar, distinguiéndose entre materiales genéticos de senescencia demorada (stay-green, SG) y acelerada (fast dry down, FDD). Algunos materiales SG denominados "cosméticos" son no funcionales (Thomas and Howarth 2000), algo que claramente no es el caso del híbrido SG usado en este estudio. Los híbridos SG en girasol presentaron tasas de extracción de agua del suelo superiores a los híbridos FDD, asociado a valores de DLRV mayores (Lisanti et al. 2013). Por último, Lisanti et al. (2012) y Chimenti et al. (2014) demostraron, también en girasol, que modificaciones en las relaciones fuente-destino durante el período de llenado de frutos que incrementen la DLRV retrasan el inicio de la senescencia foliar. Estos resultados estarían indicando la participación potencial de las raíces vivas, posiblemente vía

fluctuaciones en la concentración de citocininas exportadas a la parte aérea, con el inicio de la senescencia del canopeo. Este conjunto de observaciones sugieren que el girasol, en sus formas SG y FDD, constituye un modelo experimental apropiado para examinar el posible rol de las citocininas en el control de la senescencia foliar y su papel en la comunicación raíz/hoja durante la etapa de llenado de frutos.

## **1.5 Justificación de la investigación**

La etapa de llenado de frutos es crítica para el rendimiento pues en ella se fija el peso seco de los frutos, uno de los determinantes del rendimiento, aunque puede haber efectos menores derivados del peso de los ovarios al momento de fecundación (Cantagallo et al., 2004; Lindstrom et al., 2006). A pesar de su importancia se desconoce, tanto en girasol como en otras especies, sobre las potenciales conexiones existentes entre las variaciones de la concentración de citocininas en hojas y las que se particionan a través del xilema a la parte aérea, la dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas y el inicio de la senescencia foliar. Asimismo se desconoce si además estas conexiones, permiten explicar las diferencias entre los patrones de senescencia foliar de tipo SG y FDD. Por otra parte tampoco existen precedentes en girasol (ni en ninguna otra especie cultivada) de intentos por determinar, en caso que exista, el umbral de citocininas por debajo del cual se desencadena el proceso de senescencia foliar.

La presente tesis se centró en la etapa de llenado de los frutos, e involucró el seguimiento de la dinámica de la concentración de citocininas en hojas y en el fluido xilemático conjuntamente con observaciones de la senescencia radical y la foliar, todo ello en híbridos con patrones de senescencia foliar contrastante (SG y FDD). La expectativa fue poner de manifiesto la potencial conexión entre estas variables. Para ampliar el rango de condiciones de observación se manipularon los cultivos mediante cambios en las relaciones fuente-destino de fotoasimilados (eliminación de frutos). Además se intentó determinar el posible umbral de citocininas por debajo del cual se desencadena el proceso de senescencia foliar, con aplicaciones exógenas de citocininas a las hojas. Los experimentos fueron realizados en condiciones de campo, y en dos campañas consecutivas 2012/13 y 2013/14. Los resultados de este trabajo, arrojan luz sobre el rol que cumplen las citocininas en las relaciones entre la senescencia foliar y la funcionalidad del sistema radical durante la etapa de llenado de frutos en el cultivo de girasol.

## 1.6 Objetivos e Hipótesis

### 1.6.1 Objetivo general

**Generar información fisiológica sólida acerca del rol que cumplen las citocininas, durante la etapa de llenado de frutos en el cultivo de girasol, en el rompecabezas de las relaciones entre la senescencia foliar y la funcionalidad del sistema radical.**

### 1.6.2 Objetivos específicos

**Objetivo específico 1: Realizar un seguimiento de la dinámica de la concentración de citocininas en hojas y en el fluido xilemático durante el llenado de frutos, y su asociación con la funcionalidad radical y la senescencia foliar, en híbridos con patrones de senescencia foliar contrastante (SG y FDD).**

*Hipótesis 1.1: Las concentraciones de citocininas en el fluido xilemático y en las hojas, están asociadas con el nivel de funcionalidad del sistema radical durante el llenado de los frutos, exhibiendo el híbrido SG una funcionalidad radical más duradera y mayores concentraciones de citocininas en el fluido xilemático y en hojas que el híbrido FDD.*

*Hipótesis 1.2: El momento de inicio y la tasa de senescencia foliar se hallan fuertemente asociadas con la concentración de citocininas en el fluido xilemático y a un umbral mínimo a nivel de hoja. Ello explica las diferencias observadas en la dinámica de la senescencia foliar entre los materiales SG y FDD.*

**Objetivo Específico 2: Establecer el umbral mínimo de citocininas por debajo del cual se puede desencadenar el proceso de senescencia foliar.**

*Hipótesis 2.1: A través de aplicaciones exógenas de citocininas, dirigidas a aumentar la concentración de las mismas en hojas, se puede revertir y/o demorar el proceso de inicio de senescencia.*

**Objetivo específico 3: Establecer si cambios impuestos a las relaciones fuente-destino de los fotoasimilados, durante llenado de frutos, modifican la concentración de citocininas en hojas y en el fluido xilemático afectando el momento de inicio y la tasa de senescencia foliar.**

*Hipótesis 3.1: Alteraciones en el coeficiente de partición de hidratos de carbono a favor del sistema radical, provocarán una mayor concentración de citocininas en el fluido xilemático y a nivel de hoja demorando el inicio de la senescencia foliar.*

## **1.7 Estructura de la tesis**

La tesis está estructurada en 5 capítulos. En el Capítulo I (Introducción General) se desarrollaron los antecedentes sobre el tema a abordar y se describe la problemática dando un marco teórico de referencia para la formulación de las hipótesis y objetivos. Los Capítulos II (Dinámica de la concentración de citocininas en hojas durante el llenado de los frutos, y su asociación con la funcionalidad radical y la senescencia foliar); III (Dinámica de la cantidad de citocininas en el fluido xilemático durante el llenado de los frutos, y umbral de citocininas foliares debajo del cual se desencadena la senescencia foliar) y IV (Efecto de la alteración en la partición de los hidratos de carbono entre los órganos de la planta sobre la senescencia foliar), corresponden a capítulos de resultados obtenidos con cada una de las aproximaciones experimentales. Estos capítulos consisten en una breve introducción que define los objetivos particulares, se detalla la metodología implementada, se describen los resultados y finalmente se discuten los aspectos particulares puestos en evidencia. Por último, el Capítulo V (Discusión general y conclusiones), incluye un análisis de los resultados en forma integrada para contrastar las hipótesis y proyectar el impacto de los resultados sobre el cultivo y futuras líneas de trabajo. Finalmente este trabajo cuenta con información complementaria, ubicada en los Apéndices 1, 2 y 3, que sirve de apoyo en relación con los abordajes de los objetivos específicos 1, 2 y 3 respectivamente.

## **Capítulo II**

### **Dinámica de la concentración de citocininas en hojas durante el llenado de frutos, y su asociación con la funcionalidad radical y la senescencia foliar<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Las Figuras 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 y 2.7; y los Cuadros 2.1, 2.2, A1.1, A1.2, A1.3 y A1.4, del presente capítulo, fueron publicados en Mangieri et al., 2017. EJA 86: 60-70. Datos de la posición 27 no incluidos por demoras en análisis químicos.

## Capítulo II

# Dinámica de la concentración de citocininas en hojas durante el llenado de frutos, y su asociación con la funcionalidad radical y la senescencia foliar

## 2.1 Introducción

La senescencia foliar durante el llenado de granos puede reducir el rendimiento de los cultivos limitados por fuente debido a reducciones en los niveles de fotoasimilados disponibles para el llenado de granos, tal como se documentó en cebada (*Hordeum vulgare* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Gregersen et al., 2008) y maíz (*Zea mays* L.) (Rajcan et al., 1999; Rajcan y Tollenaar, 1999). Durante la senescencia foliar se produce la degradación de los cloroplastos, el catabolismo de la clorofila y macromoléculas, tales como proteínas (Guamet et al., 1999; Lamattina et al., 1985; Martínez et al., 2008), ácidos nucleicos y lípidos de membrana, en lo que se conoce como el proceso de desmantelamiento del aparato fotosintético. Esto da como resultado la re-movilización de gran parte del contenido de nitrógeno de las proteínas fotosintéticas a otros órganos en crecimiento (Lim et al., 2007).

La regulación de la senescencia foliar está influenciada por una red de señales internas y externas (He et al., 2001; Gan y Amasino, 1997; Buchanan-Wollaston et al., 2003; Pic et al., 2002; Guamet et al., 1989; Rousseaux et al., 1996; 2000; Noodén et al., 1997; Lisanti et al., 2013; Sinclair y de Wit, 1976; Sinclair y Horie, 1989; Van Oosterom et al., 2010). Dentro de las señales internas, las fitohormonas cumplen un papel clave en la inducción de la senescencia, siendo las citocininas las más importantes en retrasar el proceso (Gan y Amasino, 1995; Lim et al., 2007). Por lo general, la zeatina es la citocinina libre y natural más abundante e importante en la regulación del proceso de senescencia foliar (Noodén et al., 1990; Takei et al., 2001; Sakakibara 2006). La Zeatina en su forma trans demostró ser la más activa en ensayos biológicos (Schmitz et al., 1972). Los sitios primarios de la síntesis de citocininas libres en plantas enteras son los meristemas apicales de las raíces (Akiyoshi et al., 1983; Akiyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984; Beveridge et al., 1997; Samuelson et al., 1992; Takei et al., 2001; White et al., 1934). Las citocininas se mueven desde las raíces, a través del xilema, junto con el agua y los minerales absorbidos (Itai et al., 1971; Takei et al., 2001).

En muchos cultivos anuales se ha observado que los valores de biomasa de raíces alcanzan un máximo alrededor de la floración (Gregory et al., 1978, trigo; Mengel y Barber, 1974, maíz; y Sadras et al., 1989 y Lisanti et al., 2013, girasol). Desde este momento en adelante la biomasa de las raíces comienza a disminuir o, en algunos casos, se mantiene constante. Lo mismo ocurre con la funcionalidad del sistema radical. Lisanti et al. (2013) encontraron en girasol que durante la etapa de llenado de frutos la densidad longitudinal de raíces vivas comenzó a disminuir antes de que lo hiciera el índice de área foliar verde.

En girasol existe variabilidad en los patrones de senescencia de canopeo durante el llenado de los frutos, que van entre los extremos de la senescencia demorada (stay-green, SG) y la senescencia acelerada (fast dry down, FDD). Estas diferencias están relacionadas con las variaciones en la acumulación de biomasa después de antesis (de la Vega et al., 2011; Lisanti et al., 2013).

Los resultados que se presentan en este capítulo permiten describir la dinámica de la concentración de citocininas en hojas durante el llenado de los frutos, con el objetivo de asociarla con la funcionalidad de la raíz y con la senescencia foliar en híbridos de girasol con patrones de senescencia foliar contrastante (SG y FDD). Se postula que tanto el momento de inicio como la tasa de senescencia de las hojas están fuertemente asociados con la concentración de citocininas foliares; variables que, a su vez, están influenciadas por la dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas. En consecuencia, se esperaba que el híbrido SG exhiba un período más prolongado de funcionalidad radical y mantenga la concentración inicial de citocininas en hoja por un período más largo que el híbrido FDD. No hay ningún precedente en la literatura, de girasol o de cualquier otra especie de cultivo, de estudios que hayan intentado documentar, al mismo tiempo, estas variables en cultivares con diferentes patrones de senescencia foliar.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Diseño experimental y condiciones de cultivo

Los experimentos se llevaron a cabo en la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (34 ° 35'S, 58 ° 29'W) durante dos campañas de cultivo (2012/13 y 2013/14). Las fechas de siembra fueron 22/11/12 y 30/11/13 para cada campaña respectivamente. Se utilizaron dos híbridos de girasol (Nidera Semillas SA, Argentina), que no difieren en la longitud del ciclo ni en el tiempo a floración pero exhiben diferentes patrones de senescencia foliar entre floración y madurez fisiológica. Paraíso 75 pertenece al tipo "SG" y tiene una mayor duración del área foliar verde post-antesis, mientras que Paraíso 65 pertenece al tipo "FDD" y presenta una senescencia foliar más temprana durante post-antesis. Los cultivos se sembraron bajo condiciones de campo a una densidad de 7.5 plantas m<sup>-2</sup> (obtenidos por golpes de siembra de cinco semillas cada 20 cm, y raleo en el estado de 4 hojas verdaderas), y fueron fertilizados (con un criterio de reposición con 100 kg de nitrógeno/ha y 20 kg de fósforo/ha en el estadio de V12) y protegidos de insectos (Carbofuran 48%, 3 litros/ha; lambdacialotrina 170 cm<sup>3</sup>/ha; Clorpirifos 48 EC 1 litro/ha en V12, en R2, y en R6) y enfermedades (pyraclostrobin 300 cm<sup>3</sup>/ha en V12 y en R4). La totalidad del área experimental fue protegida de la lluvia con un techo móvil (rain-out shelter) durante toda la campaña, con el fin de evitar la proliferación de enfermedades foliares. Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas con cinco repeticiones. Cada una de las cinco parcelas principales contenía dos sub-parcelas, una para cada híbrido (SG y FDD). El tamaño de cada sub-parcela era de seis hileras de 4.5 m, espaciadas a 0.65 m entre hileras y la distancia entre plantas fue de 0.20 m. Las parcelas fueron regadas con un sistema de riego por goteo, el volumen de riego estaba asociado con la evapotranspiración real de tal forma de mantener el estado hídrico del suelo cercano a capacidad de campo.

El estado de desarrollo del cultivo se registró a intervalos de una semana utilizando la escala de Schneiter y Miller (1981) a partir del estadio de doce hojas verdaderas (V12) hasta la madurez fisiológica (R9, brácteas de la inflorescencia toman un color amarillo y marrón). Tres plantas representativas no contiguas, en competencia perfecta y lejos de los bordes de la sub-parcela y de los extremos de la fila, fueron marcadas en cada sub-parcela y se utilizaron para registrar la fenología del cultivo a lo largo de toda la etapa ontogénica de llenado de frutos.



Durante el período de llenado de frutos se registró el PAR (radiación fotosintéticamente activa) incidente diario y la temperatura media diaria utilizando un registrador de datos 21X (Campbell Scientific Inc., Logan, UT), equipado con un sensor de temperatura HMP35C (Campbell Scientific, Inc) y un sensor PAR Li190SB (Li-Cor, Lincoln, NE) situado a 40 m del centro del experimento.

## **2.2.2 Variables de respuesta**

### **2.2.2.1 Densidad Longitudinal de Raíces Vivas (DLRV)**

Cada 7 u 8 días, comenzando 8 días antes del inicio de antesis (Estadío R5.1, el 10% del área del capítulo [círculos de flores externos] está en antesis) y hasta la madurez fisiológica (Estadío R9), se tomaron muestras de los estratos de 0-20, 20-40 y 40-60 cm del suelo (más de 90% del sistema radicular de girasol se encuentra en el estrato del suelo de 0-60 cm, Sadras et al., 1989, Angadi y Entz, 2002), de cada sub-parcela. Para tal fin, se utilizó un tubo de aluminio de 5 cm de diámetro insertado en el suelo, de manera perpendicular al mismo, en el punto medio entre dos plantas vecinas representativas de una fila. Dichas plantas estaban en competencia perfecta y lejos de las bordes de la sub-parcela y de los extremos de la fila. Se tomaron tres muestras por profundidad y sub-parcela en cada una de las cinco parcelas. En cada posición de muestreo se insertó el tubo tres veces en secuencia a las profundidades requeridas, y los cilindros de suelo resultantes se liberaron usando un pistón de un diámetro igual al del interno del tubo. Inmediatamente después de la extracción de la muestra de cada estrato, se tomaron 3 sub-muestras de cada cilindro muestreado (una en cada uno de los extremos y uno en el punto medio del cilindro, cada una alineada con el diámetro de la muestra) utilizando un sacabocados de 1.5 cm de diámetro. Las raíces de estas tres sub-muestras se lavaron hasta quedar libres de tierra en un tamiz de malla de 590  $\mu\text{m}$  y se utilizaron para la determinación de la densidad longitudinal de raíces vivas utilizando la metodología de Sturite et al. (2005). La misma consistió en infiltrar las raíces provenientes de las tres sub-muestras bajo condición de vacío (20 minutos a 0.3 bar de succión), con una solución preparada con 50 ml 0.6% (w/v) de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio cloruro (TTC), 50 ml de 0.06 M buffer de fosfato y (v/v) 50 ml 0.05% de un agente humectante (Tween 20). Después de la infiltración, las raíces se incubaron a 30°C durante 20 horas en la misma solución. Al final de este protocolo, las raíces vivas se tornaron de color rojo. Después de la incubación, las raíces fueron distribuidas de manera uniforme sobre la superficie de un recipiente de forma cuadrada y digitalizadas mediante un escáner EPSON Expression1600 (Seiko EPSON Corp., Japón) con una resolución de 400 dpi. Las imágenes escaneadas se analizaron utilizando WinRhizo Pro V 2008 (Regent Instruments Inc., Canada) para determinar el número de raíces vivas y muertas y la longitud de ambas categorías en función de la discriminación de colores. El largo de raíces vivas se utilizó para estimar la densidad longitudinal de raíces vivas por unidad de volumen muestreado (Lisanti et al., 2013).

### 2.2.2.2 Índice de área foliar verde (IAFV)

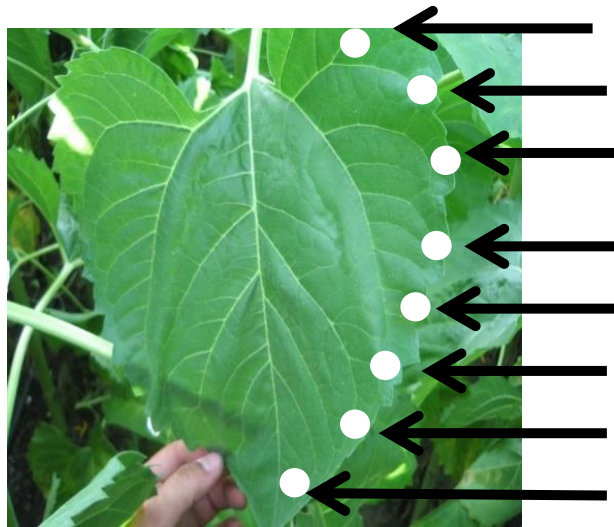
A partir de la aparición de la hoja 12 (V12), y hasta que todas las hojas alcanzaron su máxima expansión, las dimensiones individuales de la hoja (largo y ancho) fueron medidas a intervalos semanales en tres plantas representativas marcadas previamente, distribuidas al azar y no contiguas, de la parte central de cada sub-parcela de las cinco parcelas. Las áreas de las hojas individuales se estimaron como el producto del largo y el ancho multiplicado por 0.75 (Pereyra et al., 1982). El área foliar de la planta se estimó como la suma de estos valores y se usó para estimar IAFV del cultivo. Esta variable se computó a partir de la aparición de la hoja 17, ya que las hojas por encima de esta posición son las que están más asociadas con la senescencia foliar durante la etapa de llenado de frutos (Lisanti et al., 2013; Dosio et al., 2010). Una vez que comenzó la senescencia de las hojas, se registró, de manera visual, la proporción de cada hoja individual que se tornaba amarilla (denominada área senescente). Al área de hoja verde por planta se le descontó el área de hoja senescente por planta y el de las hojas abscindidas.

### 2.2.2.3 Variables de hoja

#### 2.2.2.3.1 *Clorofila Total*

Para determinar el inicio de la senescencia, se realizaron mediciones diarias de la concentración de clorofila total utilizando un medidor de clorofila portátil (SPAD 502, Konica Minolta, NJ), a partir de mediados de antesis (Estadío R5.5, el 50% de la zona del capítulo [flores del disco] está en antesis), en las posiciones de hojas marcadas (posición 17, 20, 22, 24 y 27 [sentido acrópeto]) de tres plantas representativas marcadas no contiguas y distribuidas al azar en la porción central de cada sub-parcela de las cinco parcelas. Estas mediciones continuaron hasta que el 50% de la superficie de la hoja marcada se tornó de color amarillo. Para estimar los valores de clorofila total, de ambos híbridos, sobre la base de las lecturas de SPAD, se utilizó una función lineal ajustada a la relación de clorofila total / SPAD ( $0.084x - 0.463$ ,  $R^2 = 0.9$ ,  $n = 75$ ). Para calibrar esta función, se seleccionaron hojas que cubrían el rango visual de verde a amarillo y el rango de SPAD de 1.9 a 50.9, provenientes en partes iguales de ambos híbridos. A continuación, se extrajeron tres discos foliares de 5 mm de diámetro con un punzón, se realizó una medición de SPAD en dichos discos y se promediaron los valores resultantes. Los discos se secaron con papel tissue y se pesaron para determinar su peso fresco. Los 3 discos se colocaron en un frasco de color caramelo que contenía 3 ml de N, N-dimetilformamida y se dejaron en la oscuridad durante doce horas. Mediante un espectrofotómetro (UV-1700 series, Shimadzu, Kyoto, Japón) se midió la absorbancia de la solución resultante, después de agitación vigorosa de los frascos, a longitudes de onda de 664.5 nm (clorofila A) y 647 nm (clorofila B). Los valores de absorbancia en ambos picos se introdujeron en la ecuación ( $\text{Total Chl} = 17.90A_{647} + 8.08A_{664.5}$ ) para clorofila total en solución de N, N-dimetilformamida propuesta por Inskeep y Bloom (1985) y fueron corregidos por el volumen de solvente utilizado y el peso fresco de los discos. Se decidió expresar las determinaciones de clorofila total en base al peso fresco debido a que es la forma de expresión más frecuente encontrada en la literatura publicada. Si bien es lógico presumir que el % de humedad de las hojas de

girasol disminuye durante la senescencia, no encontramos diferencias con el ajuste de la función bilineal a la marcha de la concentración de clorofila total expresada en función del área foliar (Figura 3 en Mangieri et al. [2017]). Al inicio de las mediciones (mediados de antesis R5.5), la hoja ubicada en la posición 17 era la que se encontraba dos posiciones por encima de la última hoja que presentaba signos visibles de amarillamiento (i.e. senescentes). En cada hoja individual y en cada posición seleccionada se realizaban ocho mediciones, separadas una de otra por 3cm (Fig. 2.1) y distribuidas desde el ápice hasta la base de la lámina (Guiboileau et al., 2010). El inicio de la senescencia de una hoja marcada se asumió que ocurrió cuando la concentración de clorofila total comenzó a disminuir.



**Fig. 2.1.** Diagrama de ubicación en la hoja de las posiciones utilizadas para las mediciones del SPAD.

#### 2.2.2.3.2 Fotosíntesis neta y rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII)

Se realizaron mediciones diarias de fotosíntesis neta ( $P_n$ ) y de rendimiento cuántico máximo de PSII ( $F_v/F_m$ ) en las hojas marcadas (17, 20, 22, 24 y 27 sentido acrópeto), a partir de mediados de antesis (Estadío R5.5) y continuando hasta que el 50% de la superficie de las hojas pasaba a ser senescente. Dichas mediciones se realizaron en las hojas de tres plantas etiquetadas distribuidas al azar, no contiguas de la parte central de cada sub-parcela de las cinco parcelas.

La fotosíntesis neta se midió, entre las 11 y las 14 horas en días soleados, utilizando un sistema de fotosíntesis portátil Li-6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EE.UU.) con una densidad de flujo de fotones (PPFD) de  $1500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , que permite independizar la medición de las condiciones naturales de irradiancia. La luz fue proporcionada por la fuente de luz de la cámara de la hoja 6400-40 utilizando una mezcla de 80% de rojo y 20% de luz azul. El flujo de aire, la concentración de  $\text{CO}_2$  en la cámara y la temperatura fueron configurados y controlados automáticamente por el equipo en  $300 \mu\text{mol.s}^{-1}$ ,  $400 \mu\text{mol.mol}^{-1}$  (ppm) y  $27^\circ\text{C}$ , respectivamente.

El rendimiento cuántico máximo de PSII ( $F_v/F_m$ ) se midió usando un fluorómetro de clorofila FMS 2 (Hansatech Instruments, Pentney, King's Lynn, Norfolk, Reino Unido). Este índice muestra una clara correlación con el porcentaje de centros funcionales del fotosistema II (Anderson et al., 1997), por lo que su disminución se considera un indicador de pérdida de funcionalidad de los componentes (Bilger et al., 1995; Maxwell y Johnson, 2000) de la etapa luminosa de la fotosíntesis, sin influencia de otros componentes del proceso fotosintético. Previo a la medición, las hojas fueron aclimatadas a oscuridad durante 30 minutos (Fernández and Gyenge 2010).

#### 2.2.2.3.3 Concentración de trans-Zeatina en hojas

Para cuantificar la concentración de citocininas de las hojas, se tomaron muestras a partir de mediados de antesis (Estadío R5.5) antes, durante, y después del inicio de la senescencia de las hojas marcadas, situadas en las posiciones 17, 20, 22, 24 y 27. Las muestras fueron tomadas de una planta representativa, etiquetada de la parte central de cada sub-parcela de las cinco parcelas. Antes de comenzar las mediciones, se seleccionaron plantas distribuidas aleatoriamente en la misma etapa de desarrollo. Las hojas muestreadas se tomaron de diferentes plantas en cada ocasión porque las mediciones fueron destructivas. Antes del inicio de la senescencia foliar las muestras de hojas fueron tomadas cada tres días. Una vez que la senescencia (véase la sección 2.2.2.3.1.) se inició en una de las posiciones de hoja marcada, dicha posición fue muestreada cada dos días hasta que el 50% de la superficie de la hoja se encontraba senescente. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido durante 24 horas, y después se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis químico. La extracción, la purificación y la cuantificación de las citocininas en las muestras se realizaron siguiendo la metodología descrita por Hoyerová et al. (2006). Las determinaciones de la concentración de trans-Zeatina (Z) en las hojas se llevaron a cabo por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando un cromatógrafo Agilent 1100 series (Agilent, Alemania). Para la calibración se utilizó el patrón de trans-Zeatina adquirido a Sigma Aldrich Argentina.

#### 2.2.2.4 Intensidad y calidad de la luz incidente sobre las posiciones de hoja

Con el fin de excluir la posibilidad de que las diferencias en la intensidad o en la calidad de la luz (Rousseaux et al. [1996 y 2000]; Guamet et al. [1989]) estuvieran involucradas en la determinación de las diferencias en el momento de inicio de la senescencia de las hojas de las posiciones 17, 20, 22, 24 y 27 de los híbridos FDD y SG, se midió la intensidad y la calidad de la luz incidente sobre las hojas. Estas mediciones se realizaron al principio de R5 (1 día desde el inicio de antesis [DDIA] (comienzo de floración), R6 (12 DDIA) (floración completa y marchitamiento de flores), R7 (22 DDIA) (parte posterior del capítulo de color amarillo pálido) y R8 (30 DDIA) (la parte posterior del capítulo de color amarillo, pero las brácteas permanecen verdes) (Schneiter y Miller, 1981), sobre las posiciones de hojas de tres plantas etiquetadas representativas, no contiguas y distribuidas al azar de la parte central de cada sub-parcela de las cinco parcelas. Ambas mediciones se realizaron entre las 11:00 y las 14:00 horas. La radiación se midió utilizando un sensor PAR quantum (Li-Cor Q 24122) unido a un medidor portátil LI-1000 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EE.UU.), y la relación

rojo/rojo lejano (R/RL) utilizando un medidor portátil de Rojo/Rojo Lejano (660/730) (SKR 100 36100, Skye Instruments Llandrindod Wells, Powys, Reino Unido).

### 2.2.3 Análisis estadístico

Para la mayoría de las variables de respuesta (DLRV, IAFV, concentración de clorofila total, fotosíntesis neta, fluorescencia y concentración de trans-Zeatina de la hoja), se ajustaron regresiones lineales segmentadas (también llamadas regresiones bi-lineales) utilizando el software Graph Pad Prism (versión 5.00 para Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, EE.UU., <http://www.graphpad.com/>). Se prefirieron las funciones bi-lineales en lugar de polinomios, debido a que permiten comparaciones más simples entre los tratamientos, y porque la inspección visual de la dinámica de estas variables indicó que este enfoque proporciona una descripción adecuada de los datos. Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos a través de los 2 años de experimentos se compararon los valores de los parámetros de las funciones ajustadas a las variables respuestas (es decir, la ordenada al origen, la pendiente de segmento inicial, el valor de la variable independiente correspondiente al punto de ruptura entre los dos segmentos, y la pendiente del segundo segmento lineal) utilizando análisis de la varianza (ANOVA) implementado con el software Infostat v.2011 / Profesional (Di Rienzo et al., 2010). Se utilizó la prueba de Tukey para definir el significado de las diferencias entre los tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ). Un enfoque equivalente, utilizando un modelo mixto con la estimación REML con el software Infostat v.2011 / Profesional adosado al software R (Di Rienzo et al., 2010), se utilizó para contrastar los valores de PAR y de R/RL de la luz que incide sobre cada posición de hoja, a través de los híbridos para cada tiempo de muestreo y el año. El efecto aleatorio fue la parcela, se controló la heterocedasticidad modelando por fecha de medición, y se utilizó la estructura CorAR1 para esa correlación. Las diferencias entre los tratamientos para las variables PAR y R/RL fueron evaluadas mediante la prueba LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Interacción Híbrido-Año

No se encontraron interacciones significativas ( $p > 0.05$ ) entre híbrido y año para los coeficientes de las funciones bi-lineales ajustadas a la dinámica de DLRV, IAFV, fotosíntesis neta, fluorescencia, y de la concentración de clorofila total y de trans-Zeatina en hoja (Cuadro A1.1, A1.2 y A1.3, Apéndice I). Tampoco se encontraron interacciones significativas ( $p > 0.05$ ) entre híbridos y años para los niveles de PAR y R/RL incidentes sobre las hojas en cada posición y en cada fecha de muestreo (Cuadro A1.4, Apéndice I).

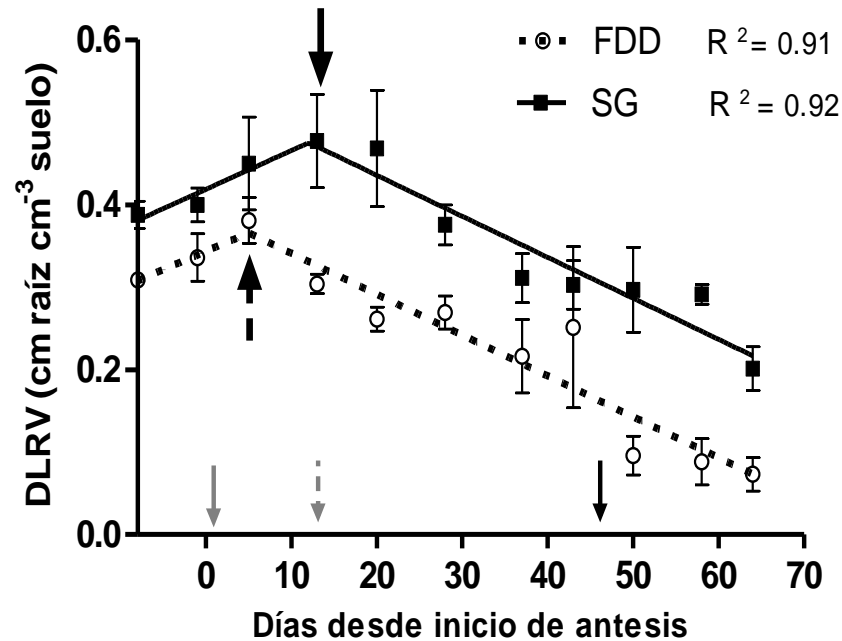
El híbrido FDD alcanzó el estadio de R5.1 (inicio de la antesis) a los 1153 °C día y a los 1156 °C día [ $T_b = 4^\circ\text{C}$ , Villalobos y Ritchie (1992)] después de la siembra, Años 1 y 2, respectivamente; mientras que el híbrido SG alcanzó el mismo estadio en 1195 °C día y 1205 °C día, Años 1 y 2, respectivamente. La madurez fisiológica (Estadio R9) se alcanzó en el híbrido FDD a los 2101 °C día y a los 2079 °C día después de la siembra, Años 1 y 2, respectivamente; mientras que el híbrido SG alcanzó el mismo estadio en

2139 °C día y 2128 °C día, Años 1 y 2, respectivamente. La temperatura media diaria del aire durante el período comprendido entre R5.1 y R9 fue de 24.7°C y 24.8°C en el híbrido FDD, y de 24.4°C y 24.5°C en el híbrido SG, en los años 1 y 2, respectivamente. El PAR incidente promedio diario para el híbrido FDD durante el período comprendido entre R5.1 y R9 fue 33.1 y 32.8 mol.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>, Años 1 y 2, respectivamente; y los valores equivalentes para el híbrido SG fueron 33.2 y 32.6 mol.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>. Por lo tanto, las condiciones ambientales durante el período de medición fueron similares entre los híbridos en el mismo año y entre años dentro de cada híbrido (Fig. A1.1, Apéndice I).

En base a estas concordancias generales de los patrones de respuesta de las variables medidas dentro de cada híbrido entre años, las tasas de desarrollo de los cultivos de cada uno de los híbridos, y la similitud de las condiciones ambientales durante el llenado de frutos a través de los años y de los híbridos, para ilustrar las respuestas y con el objeto de simplificar, en lo que sigue se presentan los datos de un solo año.

### **2.3.2 Densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV)**

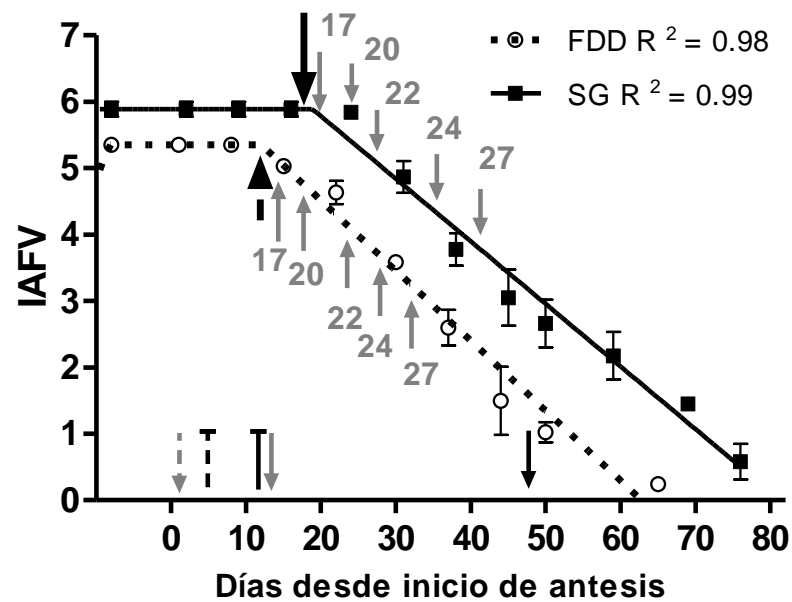
Las muestras de los estratos de suelo de 0-20 cm, 20-40 cm y 40-60 cm mostraron tendencias similares en el tiempo en la DLRV, por lo que los datos para todos los estratos se combinaron y se muestran los valores agrupados en el estrato de 0 a 60 cm (Fig. 2.2). Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre híbridos en el momento del cambio en la pendiente de DLRV, reflejando un retraso de 7 días del híbrido SG con respecto al híbrido FDD (Cuadro A1.3, Apéndice I). Además, los valores máximos de DLRV fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores (26.3%) en el SG respecto del FDD. Desde el momento en que se alcanzaron los valores máximos de DLRV, las diferencias entre los híbridos en las tasas de disminución de DLRV fueron estadísticamente no significativas ( $p > 0.05$ ). Es importante destacar que este patrón significó que el híbrido SG mostrara valores de DLRV mayores durante toda la etapa de llenado de frutos, y que la diferencia entre los híbridos haya sido proporcionalmente mayor a medida que avanzó la etapa de llenado de frutos (Fig. 2.2). Por lo tanto, los valores a 50 DDIA (unos días después de R9) para DLRV fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores (200%) en SG en comparación con FDD.



**Fig. 2.2.** Dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV), en el estrato de suelo de 0-60 cm para los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD) durante el llenado de frutos. Las flechas verticales continuas y discontinuas con trazo amplio y cerca de las funciones ajustadas, indican el tiempo en el que los híbridos SG y FDD, respectivamente, alcanzaron los picos de valores máximos de DLRV. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (gris continua), R6 (gris discontinua) y R9 (negra continua). Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. (n = 5). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.

### 2.3.3 Índice de área foliar verde (IAFV)

El momento en que los valores de IAFV empiezan a decaer respecto a su *plateau* fue significativamente ( $p < 0.05$ ) posterior en SG (18 DDIA) respecto de FDD (12 DDIA) (Fig. 2.3). Además, los valores máximos de IAFV fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores en SG respecto de FDD en ambos años, siendo esa diferencia para el Año 1 del 10% y para el año 2 del 8% (Cuadro A1.1 y A1.3, Apéndice I). Desde el momento del cambio en la tasa de los valores de IAFV, las diferencias entre híbridos en dicho parámetro no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los dos años (Cuadro A1.3, Apéndice I). Es importante destacar que el híbrido SG mantuvo los valores máximos de IAFV durante seis días después de que esta variable empezó a disminuir en el híbrido FDD. Esto provocó que el híbrido SG exhibiera valores de IAFV mayores durante toda la etapa de llenado de frutos, y que esta diferencia se haya hecho proporcionalmente mayor a medida que la etapa de llenado de frutos avanzó (Fig. 2.3). Por lo tanto, los valores a 50 DDIA (unos días después de R9) para IAFV fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores (87% en el año 1, 76% en el año 2) en el SG respecto del FDD en ambos años.



**Fig. 2.3.** Dinámica del índice de área foliar verde (IAFV), para los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD) durante el llenado de frutos. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el tiempo de inicio de la caída de IAFV en SG y FDD, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (gris discontinua), R6 (gris continua), y R9 (negra continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las flechas grises continuas de trazo estrecho cercanas a las funciones ajustadas para cada híbrido, indican el inicio de la senescencia de la hoja cuyas posiciones se indica. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.

#### 2.3.4 Dinámica de la concentración de clorofila total en hojas

La dinámica de la concentración de clorofila total en hojas de las cinco posiciones consideradas y las diferencias en esta dinámica entre los híbridos y las posiciones de las hojas se ejemplifican para el Año 1 en las Figs. 2.4 B (hoja posición 17), 2.5 B (hoja posición 20), 2.6 B (hoja posición 22), 2.7 B (hoja posición 24), 2.8 B (hoja posición 27). La dinámica básica de la concentración de clorofila total consistió en un valor de *plateau* (dado que las pendientes de la fase inicial no difirieron de 0 [ $p < 0.05$ ]) que persistió en el tiempo hasta un punto de ruptura, después del cual la concentración de clorofila total disminuyó en forma lineal. Las interacciones entre los híbridos y las posiciones de las hojas fueron significativas ( $p < 0.05$ ) para el momento de cambio de tasa y para la tasa de caída de la relación de esta variable con el tiempo



térmico desde máxima expansión de la hojas (Cuadro A1.2, Apéndice I). Estas interacciones son atribuibles principalmente a la dinámica de la concentración de clorofila total en la hoja 17, en la que pequeñas diferencias entre híbridos en la tasa de caída resultaron en valores de clorofila similares en ambos híbridos a partir de 600 °C día desde la máxima expansión de esta hoja. Las diferencias entre los valores máximos de clorofila total fueron estadísticamente no significativos ( $p > 0.05$ ) entre los híbridos y las posiciones de las hojas (Cuadros A1.2 y A1.3, Apéndice I), siendo el valor en promedio para ambos híbridos y todas las posiciones de hoja de  $2.69 \text{ mg.g}^{-1}$  peso fresco.

Las principales características que surgen de los datos de los paneles B de las Figs. 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8, es que el inicio de la fase de caída de la clorofila total, en el híbrido SG fue significativamente ( $p < 0.05$ ) posterior en las cinco posiciones de las hojas estudiadas. Este retraso provocó que el valor máximo en las hojas de las posiciones 20, 22, 24 y 27 -pero no en la hoja 17- se mantuviera en promedio  $113 \text{ °C día}$  más en el híbrido SG respecto del híbrido FDD; y que presentaran valores más altos de clorofila total a lo largo de la duración de la fase de caída, siendo (en promedio de todas las posiciones) dichas diferencias del 6% y del 40%, al inicio y al final respectivamente de la fase de caída de las hojas del híbrido FDD. Esto resultó -para las hojas 20, 22, 24 y 27 del híbrido SG- en mayores concentraciones de clorofila total durante la totalidad de la fase de caída. Exceptuando a la hoja 17, no se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ), entre las posiciones de las hojas dentro de cada híbrido, en el comienzo de la fase de caída expresado en tiempo térmico desde que la hoja alcanzó su máxima expansión. Las diferencias entre híbridos en la pendiente de la fase de caída para cada posición, fueron pequeñas, aunque para la mayoría de las posiciones (hojas 17, 20, 22 y 24) fueron significativas ( $p < 0.05$ ). Como se puede apreciar en el cuadro A1.3, el sentido de dichas diferencias no muestra un patrón consistente. Para las posiciones 17 y 20 fue mayor ( $p < 0.05$ ) en el híbrido FDD, para las posiciones 22 y 24 fue mayor ( $p < 0.05$ ) en el híbrido SG, y para la posición 27 no se encontraron diferencias significativas entre híbridos. Esto no alteró las principales características descriptas sobre la dinámica de esta variable. Las diferencias entre los híbridos en el inicio de la senescencia (punto de quiebre de la concentración de clorofila) en cada posición de hoja (ver flechas de color gris, Fig. 2.3) fueron consistentes con la observada para IAFV: la senescencia comenzó posteriormente, en todas las posiciones de hoja, en el híbrido SG.

### 2.3.5 Fotosíntesis Neta

La dinámica de la fotosíntesis neta en las cinco posiciones de hojas, y las diferencias en esta dinámica entre los híbridos y las posiciones de las hojas, se ejemplifican para el Año 1 en las Figs. 2.4 C (posición 17), 2.5 C (posición 20), 2.6 C (posición 22), 2.7 C (posición 24), 2.8 C (posición 27). Las principales características de la respuesta de  $P_n$  a híbridos, posiciones de hojas, y tiempo térmico desde máxima expansión de la hoja fueron similares a las exhibidas por la concentración de clorofila total en hojas. Las diferencias entre los valores máximos de  $P_n$  fueron estadísticamente no significativas ( $p > 0.05$ ) entre los híbridos y las posiciones de las hojas (Cuadros A1.2 y A1.3, Apéndice I), siendo el valor en promedio para ambos híbridos y todas las posiciones de hoja de  $37 \text{ } \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , valores similares de fotosíntesis máximas a los medidos por otros autores en girasol (Rodríguez et al. [1998], Connor et al. [1993], Rawson and Constable [1980]). En las cinco posiciones de hoja, la fase de caída comenzó significativamente ( $p < 0.05$ ) más tarde en el híbrido SG. Este retraso provocó

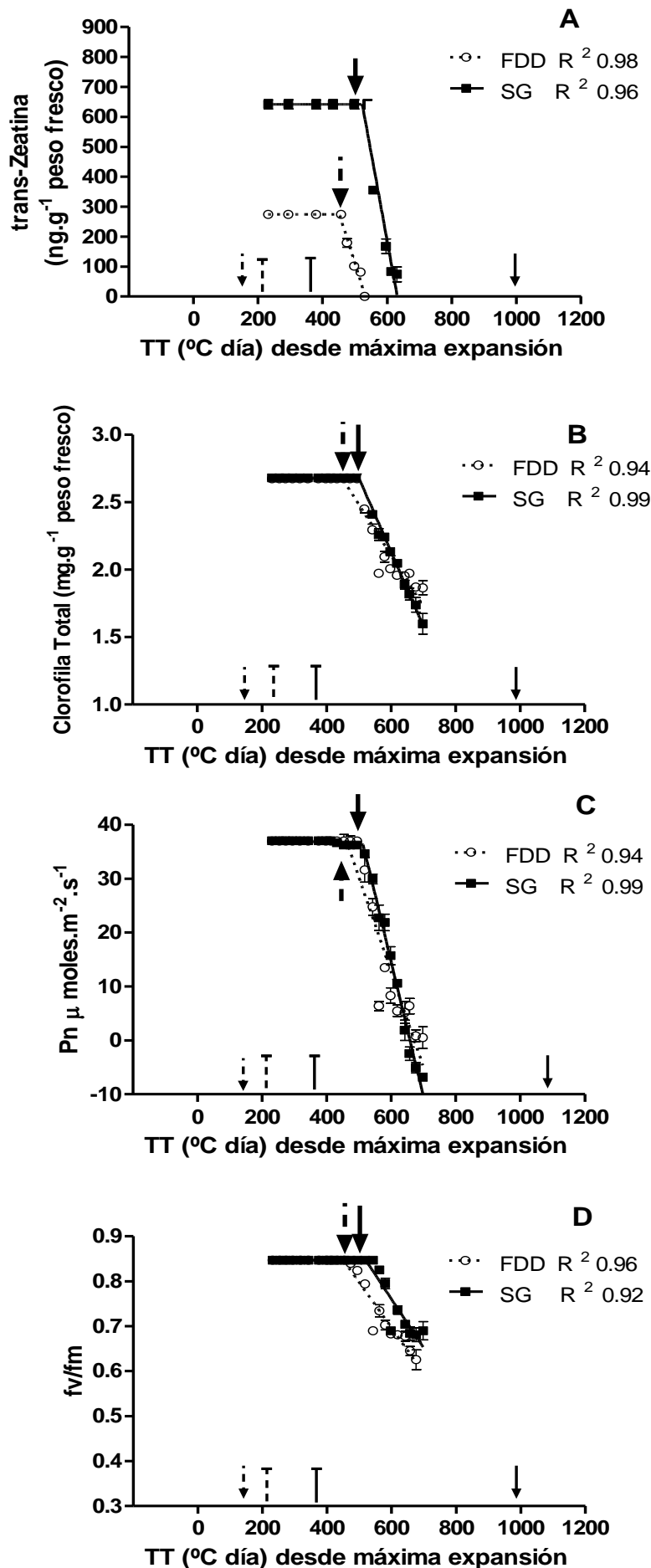
que las hojas de las posiciones 20, 22, 24 y 27 -pero no en la hoja 17- del híbrido SG presentaran tasas de  $P_n$  máximas en promedio durante 120°C día más que aquellas del híbrido FDD; y que presentaran valores más altos de  $P_n$  a lo largo de la duración de la fase de caída, siendo (en promedio de todas las posiciones) dichas diferencias del 9% y del 742%, al inicio y al final respectivamente de la fase de caída de las hojas del híbrido FDD. Las diferencias en el momento de inicio de la fase de caída entre las posiciones de las hojas o en la pendiente de la fase de caída entre híbridos y/o posiciones de las hojas no alteraron las principales características de las Figs. 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8 panel C. Gran parte de la interacción entre las posiciones de las hojas (Cuadros A1.2 y A1.3, Apéndice I) para  $P_n$  se debió a las diferencias en el patrón temporal entre la hoja 17 y las hojas de las cuatro posiciones restantes. Es importante destacar que, el inicio de la fase de caída de  $P_n$  se encontró claramente asociada con el inicio de la caída de la concentración de clorofila total (ver las flechas cerca de las funciones ajustadas, Figs. 2.4 C [posición 17], 2.5 C [posición 20], 2.6 C [posición 22], 2.7 C [posición 24], 2.8 C [posición 27]).

### 2.3.6 Rendimiento cuántico del Fotosistema II (PSII)

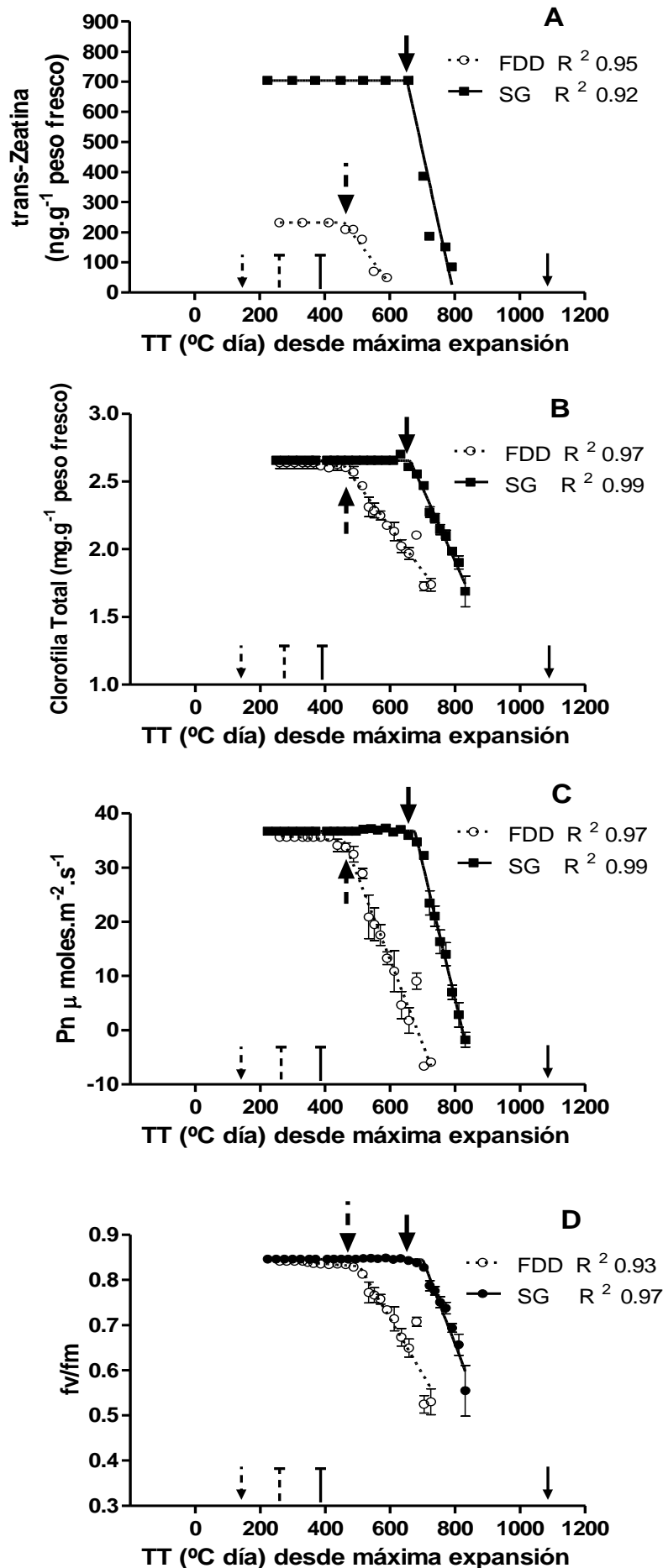
La dinámica de  $F_v/F_m$  en las hojas de las cinco posiciones consideradas, y las diferencias en esta dinámica entre los híbridos y las posiciones de las hojas, se ejemplifican para el Año 1 en las Figs. 2.4 D (posición 17), 2.5 D (posición 20), 2.6 D (posición 22), 2.7 D (posición 24), 2.8 D (posición 27). Al igual que con la clorofila total y que con la  $P_n$ , no se encontraron diferencias en los valores máximos de  $F_v/F_m$  (0.85 en promedio para todas las posiciones en ambos híbridos) entre las posiciones de las hojas y los híbridos. Al igual que en las otras dos variables mencionadas, se observó un retraso en el momento del inicio de la fase de caída en el híbrido SG (109° C día en promedio para todas las posiciones en ambos híbridos). Respecto a la pendiente de la fase descendente se encontraron pequeñas diferencias que condujeron a mayores valores de  $F_v/F_m$  en las hojas del híbrido SG en las cinco posiciones. Estas diferencias en los valores de  $F_v/F_m$ , a favor del híbrido SG y en promedio de todas las posiciones, fueron del 2% y del 25% al inicio y al final respectivamente, de la fase de caída en las hojas del híbrido FDD. Las diferencias en el momento de inicio de la fase de caída entre las posiciones de las hojas o en la pendiente de la fase de caída entre híbridos y posiciones de las hojas no alteraron las principales características descriptas sobre la dinámica de esta variable. Al igual que con  $P_n$ , el momento del inicio de la fase de caída en los valores de  $F_v/F_m$  a través de las posiciones y los híbridos estuvo estrechamente asociado con el comienzo de la caída de los valores de clorofila total de la hoja (ver las flechas cerca de las funciones ajustadas en las Figs. 2.4 D [posición 17], 2.5 D [posición 20], 2.6 D [posición 22], 2.7 D [posición 24], 2.8 D [posición 27]).

### 2.3.7 Dinámica de la concentración de trans-Zeatina en hojas

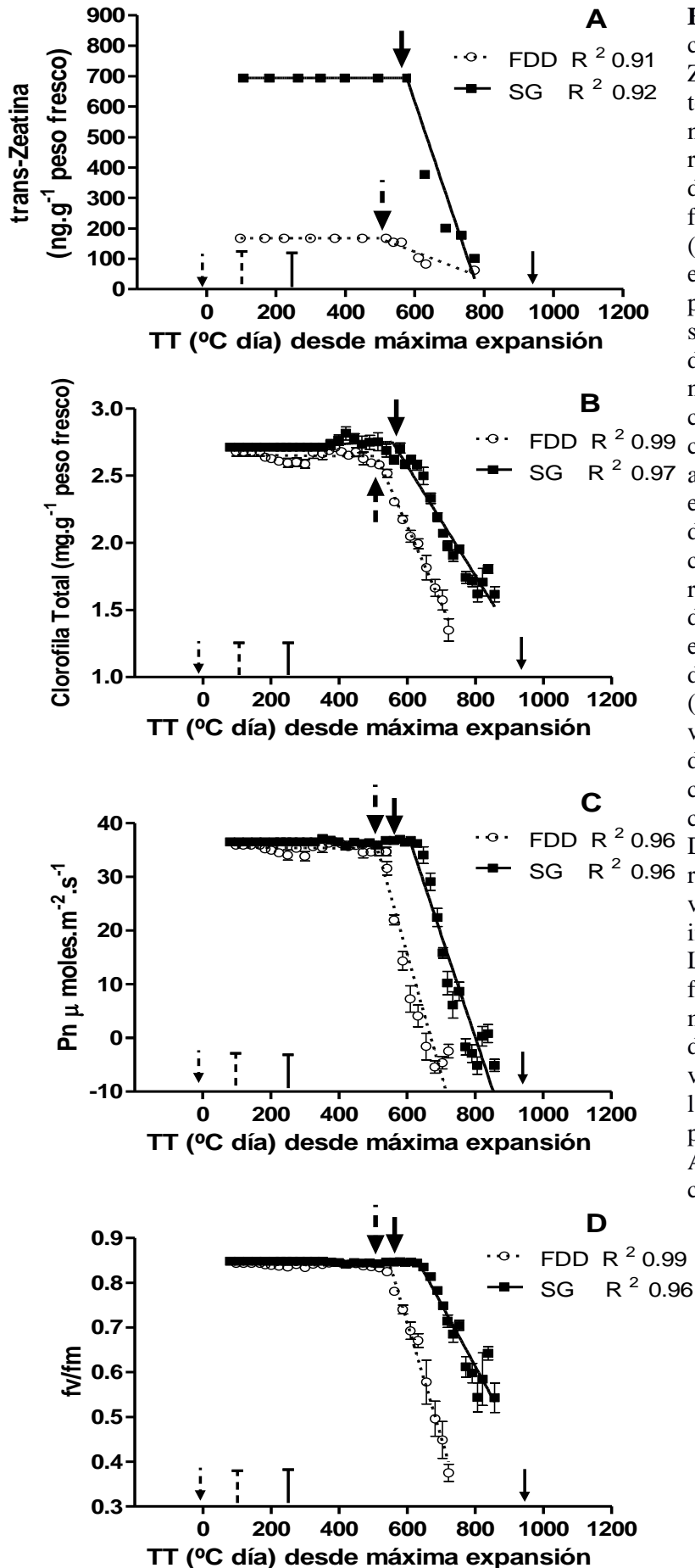
La dinámica de la concentración de trans-Zeatina en las cinco posiciones de hojas y las diferencias en esta dinámica entre los híbridos y las posiciones de las hojas se ejemplifica para el Año 1 en las Figs. 2.4 A (posición 17), 2.5 A (posición 20), 2.6 A (posición 22), 2.7 A (posición 24), 2.8 A (posición 27). Dentro de las características sobresalientes de la dinámica de la concentración de trans-Zeatina, encontramos en primer lugar la muy amplia y significativa ( $p < 0.05$ ) diferencia en las concentraciones iniciales (*plateau*) entre los híbridos (134%, 204%, 316%, 698% y 834% para las posiciones 17, 20, 22, 24 y 27 respectivamente) y entre las posiciones (en relación a la posición 17: disminuyendo en el híbrido FDD en un 15%, 39%, 63% y 66% posiciones 20, 22, 24 y 27 respectivamente; e incrementándose en el híbrido SG en un 10%, 8%, 26% y 35% posiciones 20, 22, 24 y 27 respectivamente). En segundo lugar, se observa un retraso significativo ( $p < 0.05$ ) en el momento de inicio de la fase de caída en el híbrido SG (119 °C día en promedio para todas las posiciones); y en tercer y último lugar se observa una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la pendiente de la fase de caída (mayor en el híbrido SG) (Cuadros A1.2 y A1.3, Apéndice I). La diferencia en los valores iniciales de trans-Zeatina entre los híbridos SG y FDD era tan grande (Cuadros A1.2 y A1.3, Apéndice I), que las hojas del híbrido SG mantuvieron mayores valores de trans-Zeatina durante todo el período de medición siendo (en promedio de todas las posiciones) dichas diferencias del 437% y del 1321%, al inicio y al final respectivamente del período de medición de las hojas del híbrido FDD. Hubo algunas interacciones significativas entre híbridos y posición de hoja para los valores iniciales (*plateau*) de trans-Zeatina (con una disminución significativa [ $p < 0.05$ ] con el incremento de la posición de la hoja en FDD y generalmente con incrementos significativos [ $p < 0.05$ ] en SG); y entre posiciones de hojas en el momento de inicio de la fase de caída y en la pendiente de la fase de caída; pero no alteraron las principales características descritas sobre la dinámica de esta variable. Al igual que con Pn y  $F_v/F_m$ , hubo una fuerte asociación –a través de las posiciones de las hojas y los híbridos- entre los momentos de inicio de la caída de los valores de trans-Zeatina y los de clorofila total (ver las flechas cerca de las funciones ajustadas en las Figs. 2.4 A [posición 17], 2.5 A [posición 20], 2.6 A [posición 22], 2.7 A [posición 24], 2.8 A [posición 27]).



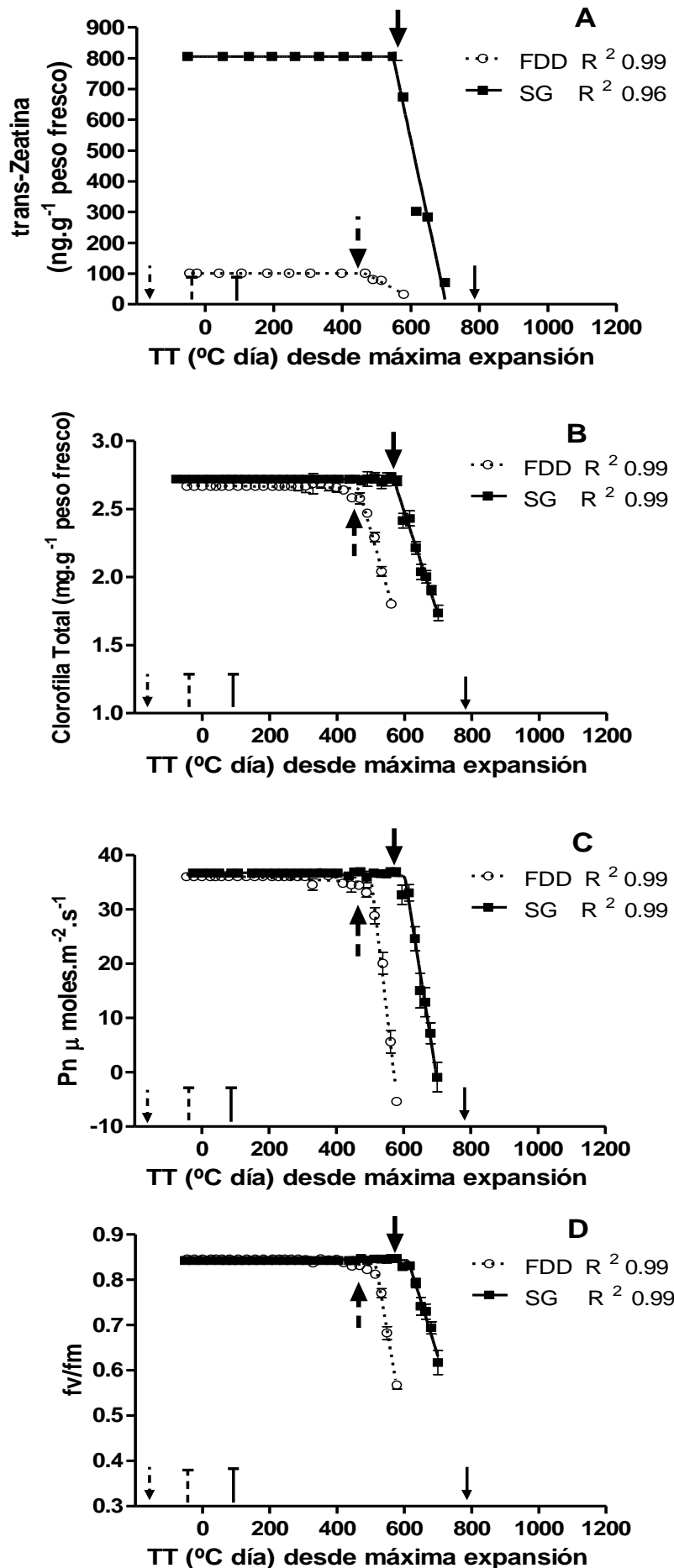
**Fig. 2.4.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta ( $\text{Pn}$ ) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D) en función del tiempo térmico ( $\text{Tb } 4^{\circ}\text{C}$ ) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 17, en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD). Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en SG y FDD, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.



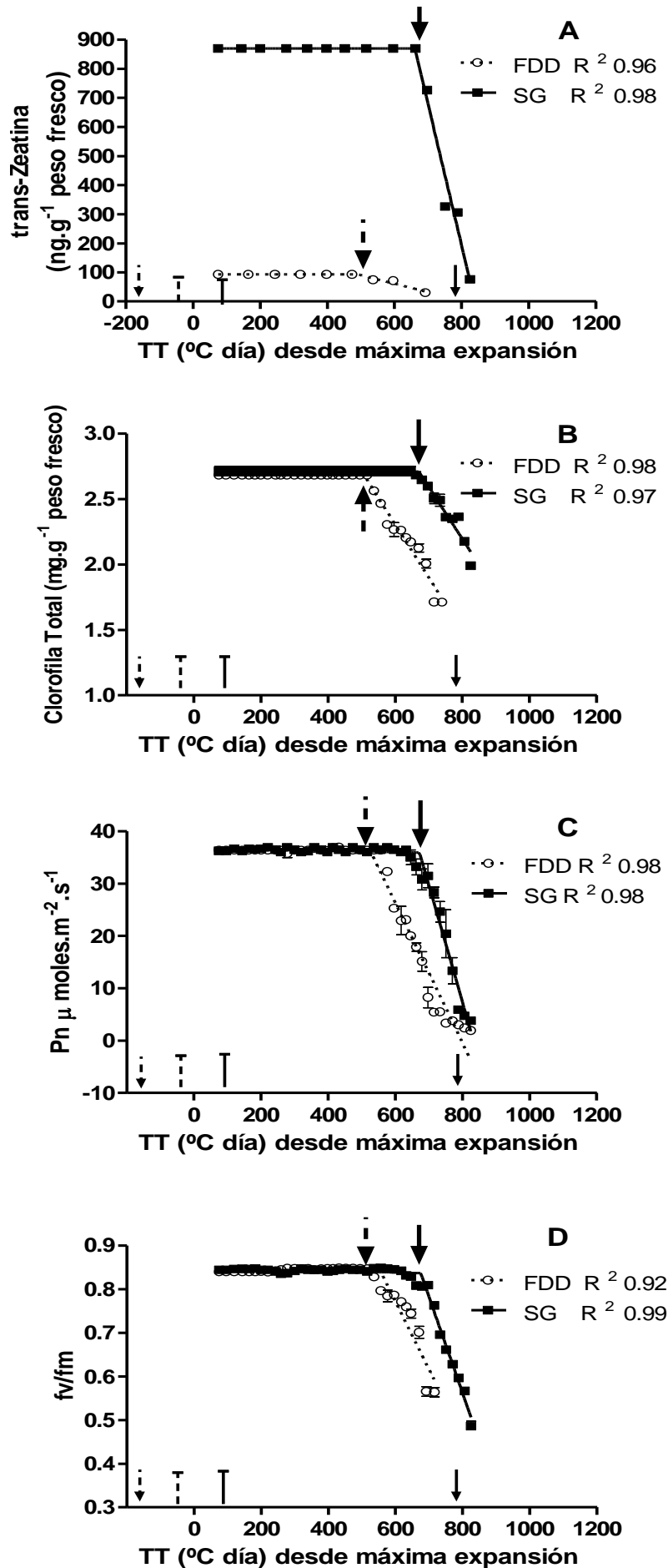
**Fig. 2.5.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D) en función del tiempo térmico (Tb 4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 20, en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD). Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en SG y FDD, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. (n = 5). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.



**Fig. 2.6.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D) en función del tiempo térmico (Tb 4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 22, en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD). Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en SG y FDD, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. (n = 5). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.



**Fig. 2.7.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D) en función del tiempo térmico ( $T_b$  4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 24, en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD). Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en SG y FDD, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.



**Fig. 2.8.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) (D) en función del tiempo térmico (Tb 4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 27, en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD). Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en SG y FDD, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. (n = 5). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A1.3, Apéndice I. Datos correspondientes al Año 1.



### 2.3.8 Comparaciones de los momentos de cambios de pendiente (*plateau* previo a la caída > fase de caída) de la dinámica de las variables de hoja

Una comparación del momento de cambio de la fase de *plateau* a la fase de caída, a través de las posiciones de las hojas y los híbridos, para el conjunto de las cuatro variables de hoja consideradas (Cuadro 2.1) mostró que este momento fue siempre significativamente ( $p < 0.05$ ) posterior en el híbrido SG con respecto al híbrido FDD. Además, las comparaciones de este momento de cambio de fase entre las variables de la hoja, dentro de cada posición y para cada híbrido, mostraron que las diferencias entre los momentos de cambio de pendiente de Pn y trans-Zeatina fueron estadísticamente no significativas ( $p > 0.05$ ) de los de clorofila en ambos híbridos, con la excepción de la hoja 24. Por el contrario, el momento del cambio de pendiente de  $F_v/F_m$  fue ligeramente posterior que el de las otras tres variables en cinco de las diez combinaciones híbrido por posición de hoja. En nuestro sistema, el momento de la transición de la fase de *plateau* a la fase de caída de la clorofila resultó ser un indicador robusto y sencillo de medir para determinar el inicio de la senescencia foliar, lo que se refleja en el comportamiento de las otras tres variables consideradas a nivel de hoja.

**Cuadro 2.1.** Momento en el cual ocurre el cambio de fase (*plateau* previo a la caída > fase de caída) en la evolución de la dinámica de la clorofila total, de la fotosíntesis neta, del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) y de la concentración de trans-zeatina en las cinco posiciones de hoja estudiadas (17, 20, 22, 24 y 27) en un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG). Cada valor corresponde al tiempo térmico (TT) [ $T_b = 4^\circ\text{C}$ , Villalobos y Ritchie (1992)] acumulado desde la finalización de la expansión de la hoja, y es promedio de cinco observaciones ( $n = 5$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) dentro de cada combinación híbrido x posición de hoja (filas del cuadro). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre híbridos para cada posición de hoja. Datos correspondientes al Año 1.

<b>Híbrido</b>	<b>Posición de Hoja</b>	<b>Clorofila Total</b>			<b>Fotosíntesis Neta</b>			<b><math>F_v/F_m</math> TT</b>			<b>trans-Zeatina</b>		
		<b>TT (<math>^\circ\text{C día}</math>)</b>			<b>TT (<math>^\circ\text{C día}</math>)</b>			<b>(<math>^\circ\text{C día}</math>)</b>			<b>TT (<math>^\circ\text{C día}</math>)</b>		
<b>FDD</b>	<b>17</b>	449	a	B	462	a	B	472	a	B	451	a	B
<b>SG</b>	<b>17</b>	500	a	A	515	a	A	520	a	A	522	a	A
<b>FDD</b>	<b>20</b>	465	b	B	458	b	B	506	a	B	460	b	B
<b>SG</b>	<b>20</b>	660	a	A	676	a	A	702	a	A	653	a	A
<b>FDD</b>	<b>22</b>	508	b	B	512	b	B	551	a	B	499	b	B
<b>SG</b>	<b>22</b>	561	b	A	609	ab	A	633	a	A	577	ab	A
<b>FDD</b>	<b>24</b>	464	b	B	507	a	B	518	a	B	464	b	B
<b>SG</b>	<b>24</b>	567	bc	A	593	ab	A	612	a	A	547	c	A
<b>FDD</b>	<b>27</b>	507	b	B	524	ab	B	551	a	B	491	b	B
<b>SG</b>	<b>27</b>	670	a	A	672	a	A	675	a	A	660	a	A

### **2.3.9 Intensidad y calidad de la luz incidente sobre las posiciones de hoja**

Los valores de PAR y de R/RL incidentes sobre las hojas de las cinco posiciones (17, 20, 22, 24 y 27), medidos en varias ocasiones después del inicio de antesis, se ejemplifican para el Año 1 en la Cuadro 2.2. A través de las 4 fechas, tanto el PAR como la relación R/RL aumentaron (de manera significativa [ $p < 0.05$ ]) con la posición de la hoja en ambos híbridos, asociado a la extinción de la radiación al atravesar el canopeo. En ambas variables, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tiempos de medición, en cada combinación híbrido x posición de hoja. Cuando se encontró alguna diferencia significativa entre híbridos para una combinación específica entre posición de hoja y momento de medición, los valores de ambas variables para SG fueron inferiores a los de FDD (para radiación PAR posiciones 20, 22, 24 y 27; para R/RL posiciones 20 y 22), lo que sugiere que tanto el PAR como la relación R/RL no eran las señales que intervenían en la determinación de las diferencias entre los híbridos en el inicio de la senescencia foliar.

**Cuadro 2.2.** Valores de radiación fotosintéticamente activa (PAR) (A) y de la relación Rojo/Rojo Lejano (B), sobre el canopeo y en cada una de las cinco posiciones de hoja estudiadas en un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG), medidos 1, 12, 22 y 30 días después del inicio de la antesis (DDIA), estadios R5, R6, R7 y R8, respectivamente. Cada valor corresponde al promedio de cinco observaciones ( $n = 5$ ). Los momentos de inicio de la senescencia foliar para cada posición fueron: híbrido FDD, hojas de las posiciones 17 (14 DDIA), 20 (18 DDIA), 22 (23 DDIA) y 24 (28 DDIA); híbrido SG, hojas de las posiciones 17 (17 DDIA), 20 (24 DDIA), 22 (27 DDIA) y 24 (35 DDIA). En cada variable, letras minúsculas diferentes en cada momento de observación indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los híbridos para cada posición de hoja, y entre posiciones de hoja dentro de cada híbrido. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los 4 momentos de observación, para cada combinación híbrido x posición de hoja (filas del cuadro). Datos correspondientes al Año 1.

**A**

<i>Tiempo de medición (DDIA)</i>		<i>1</i>	<i>12</i>	<i>22</i>	<i>30</i>
		<i>Radiación PAR (<math>\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}</math>)</i>			
<i>Radiación incidente fuera del canopeo/</i>		<i>1589</i>	<i>1514</i>	<i>1474</i>	<i>1363</i>
<i>Híbrido</i>	<i>Posición de hoja</i>				
<i>FDD</i>	<i>17</i>	60 a A	58 a A	74 a A	83 a A
	<i>20</i>	265 cd A	264 cd A	269 d A	281 d A
	<i>22</i>	266 cd A	264 cd A	266 cd A	283 d A
	<i>24</i>	440 e A	438 e A	442 e A	427 e A
	<i>27</i>	1319 g A	1310 g A	1325 g A	1330 g A
<i>SG</i>	<i>17</i>	38 a A	36 a A	36 a A	58 a A
	<i>20</i>	75 a A	74 a A	79 a A	80 a A
	<i>22</i>	208 b A	205 b A	210 b A	221 bc A
	<i>24</i>	313 d A	311 d A	309 d A	302 d A
	<i>27</i>	1135 f A	1132 f A	1130 f A	1143 f A

**B**

<i>Tiempo de medición (DDIA)</i>		<i>1</i>	<i>12</i>	<i>22</i>	<i>30</i>
		<i>Relación Rojo/Rojo Lejano</i>			
<i>Relación Rojo/Rojo Lejano fuera del canopeo/</i>		<i>1.10</i>	<i>1.11</i>	<i>1.12</i>	<i>1.08</i>
<i>Híbrido</i>	<i>Posición de hoja</i>				
<i>FDD</i>	<i>17</i>	0.24 a A	0.23 a A	0.22 a A	0.26 a A
	<i>20</i>	0.56 b A	0.55 b A	0.55 b A	0.6 b A
	<i>22</i>	0.60 b A	0.58 b A	0.59 b A	0.62 b A
	<i>24</i>	0.64 b A	0.64 b A	0.62 b A	0.61 b A
	<i>27</i>	0.99 c A	1.05 c A	1.02 c A	0.97 c A
<i>SG</i>	<i>17</i>	0.20 a A	0.19 a A	0.17 a A	0.22 a A
	<i>20</i>	0.26 a A	0.25 a A	0.25 a A	0.26 a A
	<i>22</i>	0.28 a A	0.28 a A	0.27 a A	0.27 a A
	<i>24</i>	0.66 b A	0.65 b A	0.68 b A	0.68 b A
	<i>27</i>	1.01 c A	1.02 c A	0.99 c A	0.96 c A

## 2.4 Discusión

Las diferencias en la senescencia foliar entre los híbridos no pueden ser atribuidas a variaciones en el desarrollo del cultivo o a las condiciones ambientales a las que estaban expuestos los híbridos (ver sección 2.3.1.). Además, las diferencias en el inicio de la senescencia entre los híbridos no se asociaron con diferencias en el PAR y/o en la calidad de la luz (relación R/RL) incidentes sobre las posiciones de hojas estudiadas (Cuadro 2.2). Estos últimos resultados contrastan con los de Rousseaux et al. (1996, 2000), los cuales encontraron que en la fase de pre-antesis reducciones en el PAR y/o en la relación R/RL pueden dar inicio a la senescencia foliar. Esto sugiere que en la fase de post-antesis (desde la hoja de la posición 17 en adelante), durante la cual se fija buena parte del peso del fruto, otros controles operan, entre ellos, las variaciones en las concentraciones de citocininas.

Los resultados del presente capítulo sugieren que una explicación plausible para el control del proceso de senescencia foliar y sus diferencias entre híbridos es la caída en la DLRV con el avance de la ontogenia como una fuente de citocininas que conducen a una caída en la concentración de citocininas foliares. Además, profundizan y amplían los de Lisanti et al. (2013), ya que ellos descubrieron que la DLRV comenzó a disminuir antes de que se inicie la senescencia foliar durante la etapa de llenado de frutos. Nuestros resultados no solo confirman estos hallazgos (Fig. 2.2 y 2.3; Cuadro A1.3, Apéndice I) sino que muestran en forma conjunta, en ambos híbridos, que además existe una conexión positiva entre el inicio de la caída en la DLRV con la caída de la concentración de citocininas foliares y el inicio de la senescencia foliar reflejado en las caídas de la concentración de clorofila foliar, en la fotosíntesis neta y en *Fv/Fm* (Fig. 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8; Cuadro 2.1; Cuadro A1.3, Apéndice I). En otras especies, como tabaco (Singh et al., 1992; Gan y Amasino, 1995; Ori et al., 1999), lechuga (*Lactuca sativa* L.) (McCabe et al., 2001), *Phragmites australis* (Conrad et al., 2015), arroz (Liu et al., 2016), maíz (Ren et al., 2016), *Xanthium* (Richmond y Lang, 1957), soja (Noodén et al., 1979) y *Arabidopsis thaliana* (Masferrer et al., 2002), se ha demostrado que las caídas en la concentración de citocininas foliares están asociadas al inicio de la senescencia foliar. En sorgo, Ambler et al. (1992) demostraron que las concentraciones de citocininas de la savia del xilema eran mayores en un genotipo de senescencia retardada. No obstante en ninguno de los trabajos anteriores se ha vinculado estos efectos con mediciones de la funcionalidad de las raíces.

Los resultados de este capítulo también muestran que la clorofila total (medido en gramo de peso fresco), es un buen indicador del inicio de la disminución en los niveles de otros indicadores de funcionalidad foliar ya que en la mayoría de los casos no se encontraron diferencias significativas entre el momento de inicio de las disminuciones en los niveles de las cuatro variables foliares analizadas (Cuadro 2.1). Todas las variables de hoja medidas en las distintas posiciones, disminuyeron antes en el híbrido FDD en relación al híbrido SG (Figs. 2.3 [flechas grises numeradas], 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8). Los puntos de ruptura de las funciones bilineales ajustadas a las variables a nivel de hoja (Figs. 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8) ocurrieron, sucesivamente acorde al nivel de inserción (orden acrópeto), al incrementarse el tiempo térmico después del inicio de la caída de los valores de DLRV. Si, como nuestros resultados sugieren, la tasa de suministro de citocininas desde las raíces a las hojas es un factor importante en la regulación de la senescencia foliar, las diferencias en las concentraciones iniciales de citocininas entre las posiciones foliares indican que las diferencias en la partición del fluido xilemático, entre las hojas, también podría desempeñar un papel importante determinando la secuencia de la senescencia con la posición de la hoja. Neumann y

Stein (1984) han demostrado que una disminución en el flujo de la savia del xilema a las hojas precede a la senescencia. Posiblemente, las diferencias en la exposición de la hoja a la radiación incidente (Cuadro 2.2) y por lo tanto, la transpiración de la hoja, pueden estar involucradas (Shin et al., 2014). Sin embargo, no debe pasarse por alto que la senescencia foliar es un proceso complejo en el que los efectos de varias señales internas y externas se integran en las vías de senescencia dependientes de la edad de la hoja (Lim et al., 2007), y que la interacción entre las raíces como fuente de citocininas, la radiación y la transpiración pueden no ser los únicos factores involucrados.

Las diferencias entre SG y FDD en la dinámica de la senescencia foliar no se debieron únicamente a la diferencia en los momentos de caída, sino que también se debió a la gran diferencia en los valores iniciales de trans-Zeatina en hojas entre ambos híbridos (Panel A de las Figs. 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8). El inicio de la senescencia foliar de los dos híbridos se asoció más bien a un posible valor umbral de trans-Zeatina muy diferente que marcó el inicio de la caída de la misma. Además, el retraso en el inicio de la caída de la DLRV, los mayores niveles de dicha variable durante todo el período de medición hasta madurez fisiológica (Fig. 2.2), y los mayores niveles de transpiración que presentó el híbrido SG (ver Capítulo III Fig. 3.2 de la presente tesis y además en Lisanti et al., 2013), pueden haber sido factores claves para determinar las diferencias, entre los híbridos, en la concentración de trans-Zeatina en las hojas.

En resumen, los resultados de este capítulo muestran la existencia de una robusta conexión entre el sistema radical, la concentración de citocininas en hojas y el inicio de la senescencia foliar posiblemente a través de fluctuaciones en las concentraciones de citocininas transportadas con el fluido xilemático y relacionados a los cambios en la DLRV con la ontogenia del cultivo.

En el siguiente capítulo se presentarán los resultados referidos a la dinámica de la concentración de citocininas en el fluido xilemático con la ontogenia y su relación con la dinámica de la DLRV, en ambos híbridos durante el período comprendido entre inicio de antesis y madurez fisiológica. Asimismo se presentarán los resultados obtenidos a partir de aplicaciones exógenas, en pos de demostrar la existencia de un umbral de citocininas en hojas a partir del cual disminuciones en el mismo provocan el inicio del proceso de senescencia foliar. También se evaluará si dicho posible umbral es similar entre posiciones y entre híbridos con diferente patrón de senescencia foliar. Por último estos resultados también permitirán demostrar si el girasol puede ser incluido en la lista de especies donde se ha demostrado concretamente que las citocininas participan en el retraso de la senescencia foliar.

## **Capítulo III**

### **Dinámica de la cantidad de citocininas en el fluido xilemático durante el llenado de los frutos, y umbral de citocininas foliares debajo del cual se desencadena la senescencia foliar<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> Figuras 3.3 y 3.4, del presenta capítulo, fueron publicadas en Mangieri et al., 2017. EJA 86: 60-70.

## Capítulo III

### **Dinámica de la cantidad de citocininas en el fluido xilemático durante el llenado de los frutos, y umbral de citocininas foliares debajo del cual se desencadena la senescencia foliar**

#### **3.1 Introducción**

Los meristemas apicales de la raíz, son los principales sitios de síntesis de citocininas libres a nivel de planta entera. Las citocininas sintetizadas en el sistema radical se mueven hacia la parte aérea a través del xilema junto con el agua y los minerales absorbidos por las raíces (Samuelson et al., 1992; Takei et al., 2001). Esta vía de circulación de citocininas ha sido identificada a partir del análisis del exudado xilemático. Los factores ambientales que interfieren con la funcionalidad radical, tales como la escasez de agua, pueden reducir la concentración de citocininas en el exudado del xilema (Itai y Vaadia 1971). Por otro lado, bajo situaciones de déficit de nitrógeno, el suministro de nitrato a las raíces de maíz (*Zea mays* L.) resultó en un incremento de la concentración de citocininas en la savia del xilema (Samuelson 1992). Las citocininas en el exudado del xilema también se encuentran conjugadas como ribósidos de zeatina (Takei et al., 2001). Una vez que alcanzan las hojas, algunos de estos nucleósidos se convierten en la forma de base libre o de glucósidos que son las formas activas (Noodén y Letham 1993). Noodén et al. (1990) encontraron, en el exudado del xilema de soja (*Glycine max* L.), que el ribósido de zeatina, el ribósido de dihidrozeatina, la zeatina y la dihidrozeatina eran las formas de citocininas más importantes presentes en el exudado, aunque otras formas desconocidas al momento no se podían descartar.

En varias especies se ha demostrado que la aplicación exógena de citocininas retrasa la senescencia de las hojas (Liu et al., 2016; Ren et al., 2016; Singh et al., 1992). La aplicación exógena de 6- bencilaminopurina (BAP), en maíz retrasó la senescencia foliar, mantuvo la concentración de clorofila y mejoró la performance de la fotosíntesis neta (Ren et al., 2016). Además provocó el retraso de la senescencia de la hoja bandera de arroz (*Oryza sativa* L.) (Liu et al., 2016). En estudios realizados por Singh et al. (1992) en hojas de tabaco analizadas en 4 estados de desarrollo, encontraron que la citocinina presente en mayor cantidad era la zeatina (Z). Asimismo demostraron que las aplicaciones exógenas de dihidrozeatina y de zeatina, fueron las más efectivas en retrasar la senescencia foliar.

En este capítulo se presentan, en primer lugar, los resultados del seguimiento de la dinámica de la cantidad de citocininas presentes en el fluido xilemático recogidas durante el llenado de frutos, y sus asociaciones con la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) y con la senescencia foliar. Estos estudios fueron efectuados en híbridos de girasol con patrones de senescencia foliar contrastante (Stay- Green [SG] y Fast dry down [FDD]). Con respecto a ello, se postula que la cantidad de citocininas en el fluido xilemático está asociada positivamente con la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV), exhibiendo el híbrido SG mayores niveles de DLRV (Lisanti et al., 2013) y de citocininas en el fluido xilemático que el híbrido FDD, lo cual repercute en el momento de inicio y en la tasa de senescencia foliar. No existen antecedentes de estudios que hayan intentado documentar, al mismo tiempo, estas variables en cultivares con diferentes patrones de senescencia foliar en girasol y/o en cualquier otra especie cultivada. En segundo lugar, se presentarán resultados obtenidos mediante la

manipulación de la concentración de citocininas en hojas mediante aplicaciones exógenas, con los objetivos de establecer la participación de estas fitohormonas en la senescencia foliar en girasol; y de establecer la existencia de un umbral de citocininas por debajo del cual se inicia el proceso de senescencia foliar verificando si el mismo es igual para todas las posiciones de inserción foliar estudiadas y entre híbridos. En relación a ello, se postula que las aplicaciones de citocininas exógenas aumentarán la concentración de esta fitohormona en las hojas por encima de un valor umbral, revirtiendo o retrasando el inicio de la senescencia foliar. No existen precedentes en girasol, o en cualquier otra especie cultivada, de intentos por determinar la concentración de citocininas por debajo de la cual se desencadena el proceso de senescencia foliar.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Diseño experimental y condiciones de cultivo**

Los experimentos se llevaron a cabo en la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (34 ° 35'S, 58 ° 29'W) durante dos campañas de cultivo (2012/13 y 2013/14). Los ensayos son los mismos del Capítulo II, por lo tanto en la sección 2.2.1 se pueden ver las fechas de siembra, híbridos, densidades, condiciones de crecimiento, diseño experimental, datos de la dinámica de la fenología, y de las variables ambientales. La unidad experimental fue la parcela.

### **3.2.2 Variables de respuesta**

#### **3.2.2.1 Densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) e índice de área foliar verde (IAFV)**

Para la determinación de la DLRV y del IAFV, se siguió la metodología descrita en el capítulo II secciones 2.2.2.1 y 2.2.2.2 respectivamente.

#### **3.2.2.2 Cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogidas en el período de observación bajo -100 kPa**

El fluido xilemático fue recolectado en R3 (el entrenudo debajo del órgano reproductivo se alarga más de 2,0 cm por encima de la última hoja), y al principio y en un estadio avanzado de R4 (comienzo de apertura de la inflorescencia), de R5 (comienzo de la floración), de R6 (floración completa y marchitamiento de flores), y de R8 (la parte posterior del capítulo de color amarillo, pero las brácteas permanecen verdes) (Schneiter y Miller, 1981). La recolección del fluido xilemático se realizó al mediodía, en dos plantas representativas marcadas previamente, distribuidas al azar y no contiguas ubicadas en la parte central de cada sub-parcela de las cinco parcelas (n=5). Previo a la medición se regaban las parcelas antes del amanecer para que el suelo



estuviera cercano a capacidad de campo. Los tallos de las plantas se cortaron a una altura de 15 cm sobre la superficie del suelo. La superficie del corte se limpió con una mezcla de metanol/ácido fórmico/agua destilada (14:1:2, v/v) para inhibir la acción de las fosfatasa y evitar la pérdida de los nucleótidos. El extremo del tallo se conectó a un sistema que permitió realizar un vacío de 100kPa durante 50 minutos (Noodén et al., 1990). Se desechó el primer mililitro del fluido recogido con el fin de evitar que restos de tejidos, que hayan quedado producto del corte, interfieran en el análisis y el resto se guardó en recipientes herméticos que se congelaron en nitrógeno líquido durante 24 horas, y después se mantuvieron a -20°C hasta su análisis químico. La extracción, la purificación y la cuantificación de las citocininas de las muestras se realizaron siguiendo la metodología descrita por Hoyerová et al. (2006). La determinación de la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático estuvo compuesto por las fracciones de trans-Zeatina y de ribósido de trans-Zeatina. Dichas determinaciones fueron llevadas a cabo por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando un cromatógrafo Agilent 1100 series (Agilent, Alemania). Para la calibración se utilizaron los patrones de trans-Zeatina y de ribósido de trans-Zeatina (Sigma Aldrich Argentina: trans zeatin y trans zeatin riboside). Para estimar diferencias entre genotipos, tratamientos y momentos ontogénicos, se multiplicó el volumen recogido por la concentración de citocininas totales de dicho volumen durante la extracción de 50 minutos.

### 3.2.2.3 Flujo de savia xilemática

Con el fin de medir el flujo de savia y de estimar la transpiración de ambos híbridos a lo largo de todo el período de medición, se instalaron sensores de flujo de savia (Dynagauge Model SGB25, Dynamax Inc, Houston, TX, USA). Los mismos fueron colocados sobre la base de los tallos siguiendo las recomendaciones del fabricante, en una planta representativa de cada híbrido. Dicha planta fue marcada previamente al azar y se encontraba ubicada en la parte central de cada sub-parcela de las cinco parcelas (n=5). El funcionamiento de los sensores ha sido extensamente detallado por Steinberg et al. (1989). Brevemente, para el montaje de los mismos se requiere una serie de preparativos tales como la remoción de las hojas basales senescentes, el limpiado del tallo y la aplicación de aceite de canola, todo esto con el objetivo de favorecer un buen contacto entre el sensor y el tallo. Los sensores se instalaron 30 cm. por encima de la superficie del suelo para minimizar los efectos que pueda generar la temperatura del suelo sobre la temperatura el tallo (Weibel y de Vos, 1994), y fueron aislados térmicamente según las recomendaciones de Kjølgaard et al. (1996). Las lecturas se tomaron cada 60 segundos y los valores, durante períodos de 15 minutos, se promediaron usando un registrador de datos CR10X (Campbell Scientific, Logan, UT, USA). Los flujos totales diarios acumulados se utilizaron para estimar el flujo de transpiración de los cultivos ( $\text{mm d}^{-1}$ ), como el producto de los valores diarios de transpiración de la planta objetivo (corregidos por el área foliar promedio) por la densidad de población del cultivo. La duración del período de medición se extendió desde el comienzo de la anthesis hasta el momento en que el flujo de la savia en cada planta cayó a cero.

#### 3.2.2.4 Aplicaciones exógenas de citocininas

Se realizaron tres aplicaciones exógenas de dos tipos diferentes de citocininas sobre hojas de la posición 17 (sentido acrópeto) en cinco plantas representativas (para cada uno de los dos tipos de citocininas) de la parte central de cada sub-parcela de las cinco parcelas. Las aplicaciones se realizaron en hojas de la posición 17 ya que esta hoja se encontraba dos posiciones por encima de la que presentaba signos visuales de senescencia a mediados de antesis (Estadío R5.5, Schneiter y Miller, 1981). La primera de estas aplicaciones se realizó en el inicio de la senescencia de esta hoja (reflejado en la caída de los valores de clorofila total, véase Capítulo II, Sección 2.2.2.3.1.). Después de la primera aplicación, se monitoreó la concentración de clorofila total de la hoja evaluando si se mantuvo o se elevó y por cuánto tiempo. En el momento en que dicha concentración volvió a disminuir, se llevó a cabo la segunda aplicación. A continuación, se repitió el seguimiento de la concentración de clorofila total, evaluando si se mantuvo o se elevó y por cuánto tiempo, y cuando la concentración de esta variable cayó una vez más, se realizó la tercera aplicación. Además se monitoreó la fotosíntesis neta y el rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) de la hoja durante todo el período de tratamiento (véase capítulo II, sección 2.2.2.3.2.). Las aplicaciones se realizaron a la hora 19, momento en que la demanda atmosférica diaria se había reducido. Las condiciones meteorológicas durante las tres aplicaciones en cada año y entre años fueron similares. El volumen de aplicación fue de 2.3 ml por hoja de una solución que contenía 8 ppm de 6- bencilaminopurina (BAP, sintético) o de trans-Zeatina (Z, natural) (el volumen de aplicación y la concentración de citocininas fueron seleccionados sobre la base de resultados de experimentos preliminares utilizando una gama de concentraciones y volúmenes). Se definieron los siguientes 6 tratamientos: 1) SG Control; 2) SG BAP 8 ppm; 3) SG trans-Zeatina 8 ppm; 4) FDD Control; 5) FDD BAP 8 ppm; 6) FDD trans-Zeatina 8 ppm. Se tomaron muestras de hojas antes y 12 horas después de cada aplicación exógena de citocininas. Las muestras se almacenaron y se analizaron para determinar la concentración endógena de trans-Zeatina como se describe en el Capítulo II, Sección 2.2.2.3.3.

#### 3.2.3 Análisis estadístico

Para determinar la significancia de las diferencias entre tratamientos a través de los 2 años de experimentos se realizó (para las variables cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático [ $\text{ng} \cdot \text{minuto}^{-1}$ ] recogido en el período de observación, volumen recogido [ml], concentración de citocinina total [ $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  recogido] y para el índice “relación citocinina total ( $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  recogido). DLRV<sup>-1</sup>)” un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando un modelo mixto con la estimación REML implementado con el software Infostat v.2011 / Profesional adosado con el software R (Di Rienzo et al., 2010). El factor aleatorio fue la parcela, se controló la heterocedasticidad modelando por fecha de medición, y se utilizó la estructura CorAR1 para esa correlación. Para definir la significancia de las diferencias entre los tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ), se utilizó la prueba de LSD Fisher. El tratamiento estadístico utilizado para las variables DLRV e IAFV se encuentra detallado en el Capítulo II, Sección 2.2.3.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Interacción Híbrido-Año

No se encontraron interacciones significativas ( $p > 0.05$ ) entre híbrido y año para la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático ( $\text{ng} \cdot \text{minuto}^{-1}$ ) recogidas en el período de observación (Cuadro A2.1). De la misma manera, los patrones de respuesta de las variables de hoja de las plantas tratadas con la aplicación de citocinas exógenas fueron muy similares, dentro de cada híbrido, en ambos años.

Los datos de la dinámica de la fenología, y los valores de las variables ambientales durante los ensayos correspondientes a los dos años son los mismos informados en el Capítulo II Sección 2.3.1. Las condiciones ambientales durante el período de medición fueron similares entre los híbridos en el mismo año y entre años dentro de cada híbrido (Fig. A1.1, Apéndice I).

Las características principales de la dinámica diaria del flujo de savia, tales como los valores máximos alcanzados, los intervalos durante los cuales éstos fueron observados, así como las veces en que los flujos tendieron a cero, fueron consistentes a través de ambos años, a pesar de las diferencias en los patrones detallados entre los años. Estas diferencias se debieron a la dinámica disimilar de las variaciones interdiarias en la temperatura media diaria y en la radiación fotosintéticamente activa en los 2 años (Fig. A1.1, Apéndice I).

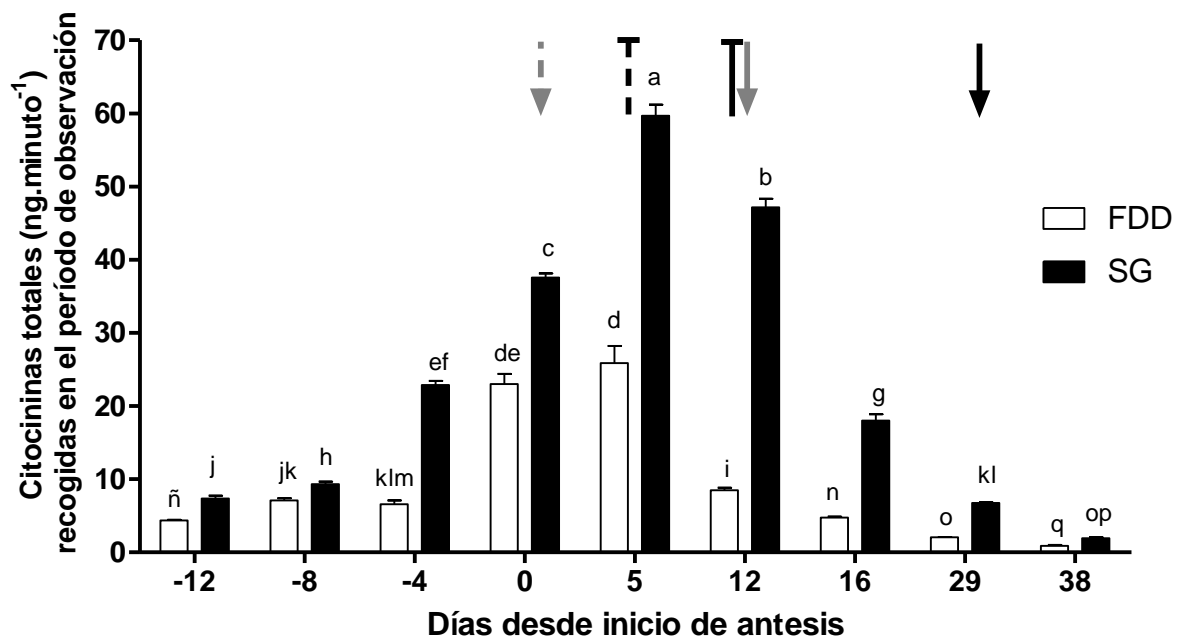
Respecto a las aplicaciones exógenas de ambas citocininas, las características principales de las respuestas tales como los valores máximos y los efectos de las aplicaciones (recuperación/mantenimiento) sobre las dinámicas de clorofila total, fotosíntesis neta, fluorescencia y trans-Zeatina, fueron similares entre ambos años dentro de cada híbrido (Figs. A.2.1 y A.2.2, Apéndice II).

En base a estas concordancias generales de los patrones de respuesta de las variables medidas dentro de cada híbrido entre años, las tasas de desarrollo de cultivos en cada uno de los híbridos, y la similitud de las condiciones ambientales durante el llenado de frutos a través de los años y de los híbridos, en lo que sigue y con el objeto de simplificar, se presentan los datos de un solo año para ilustrar las respuestas observadas.

#### 3.3.2 Cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogidas en el período de observación bajo -100 kPa

La dinámica de la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático ( $\text{ng} \cdot \text{minuto}^{-1}$ ) recogidos en cada período de observación, y las diferencias en esta dinámica entre los híbridos, se ejemplifican para el Año 1 en la Fig. 3.1. El híbrido SG presentó valores significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores (181% más en promedio) en todos los estadíos fenológicos medidos en comparación con el híbrido FDD. La dinámica de la respuesta para ambos híbridos fue similar, con las diferencias mencionadas en lo que respecta a los valores en cada período de observación. En ambos híbridos, la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático se incrementó hasta un valor máximo, que se produjo a los 5 días desde el inicio de antesis (DDIA) (Estadío R5.5, el 50% de la zona del capítulo [flores del disco] está en antesis, Schneiter y Miller, 1981). Luego de ese momento, los valores cayeron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los posteriores estadíos de medición. En relación al período de observación

inmediatamente anterior, en el híbrido FDD, la caída en R6 (12 DDIA) fue del 67%, en el estadio avanzado de R6 (16 DDIA) del 44%, en R8 (29 DDIA) del 57% y finalmente en el estadio avanzado de R8 (38 DDIA) del 56%. En el híbrido SG, la caída en R6 (12 DDIA) fue del 21%, en el estadio avanzado de R6 (16 DDIA) del 62%, en R8 (29 DDIA) del 63%, 78 y finalmente en el estadio avanzado de R8 (38 DDIA) del 72%. Se debe señalar que a pesar de la caída significativa para el híbrido SG en R6, la misma solo fue del 21% y que recién en el estadio avanzado de R6 (16 DDIA) se aprecia la mayor caída en la cantidad de citocininas totales recogidas, lo cual coincide con la caída de la DLRV (Capítulo II Fig. 2.2). También es importante remarcar el notable incremento en la cantidad de citocininas totales ( $\text{ng.minuto}^{-1}$ ) recogidas, en ambos híbridos, a partir de antesis en comparación con pre antesis (-12, -8 y -4 DDIA).



**Fig. 3.1.** Dinámica de la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogido en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD) durante el llenado de frutos. Las flechas indican los estadios fenológicos de R5.1 (gris discontinua), R6 (gris continua) y R8 (negra continua). Las líneas verticales negras continuas y discontinuas coronadas indican el comienzo de la caída en la DLRV en SG y FDD, respectivamente. Las líneas coronadas asociadas a cada barra indican  $\pm 1$  E. S. ( $n=5$ ). Letras diferentes, por encima de cada barra, indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre híbridos y días desde inicio de antesis. Datos correspondientes al Año 1.

Respecto al volumen recogido (ml) (Cuadro 3.1) el promedio entre R3 (-12 DDIA) y R8 (38 DDIA) fue de 26 ml para el híbrido FDD y de 34 ml para el SG. El volumen recolectado promedio para cada híbrido disminuyó hacia R8 en un 76% en ambos híbridos, en relación al volumen promedio recolectado entre los estadios R3-R6 fue de 33.5 ml y de 42 ml para el híbrido FDD y SG, respectivamente.

**Cuadro 3.1.** Volumen recogido y concentración de citocinina total en cada momento de observación expresado en días desde el inicio de antesis (DDIA) para un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG). Cada valor corresponde al promedio de cinco observaciones ( $n = 5$ ). Dentro de cada variable, letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre híbridos y momentos de medición. Datos correspondientes al Año 1.

<b>DDIA</b>	<b>Volumen recogido (ml)</b>				<b>Concentración de citocinina total (<math>\text{ng.ml}^{-1}</math> recogido)</b>			
	<b>FDD</b>		<b>SG</b>		<b>FDD</b>		<b>SG</b>	
<b>-12</b>	33,3	d	46,5	a	6,5	h	7,9	h
<b>-8</b>	37,0	c	48,3	a	9,6	g	10,1	g
<b>-4</b>	34,9	cd	42,0	b	9,4	g	27,2	d
<b>0</b>	34,1	cd	41,0	b	33,7	c	45,8	b
<b>5</b>	31,0	d	41,0	b	41,7	b	72,8	a
<b>12</b>	31,0	d	32,0	d	13,7	e	73,7	a
<b>16</b>	19,3	e	32,3	d	12,3	ef	27,9	d
<b>29</b>	8,3	g	12,3	f	12,4	ef	27,4	d
<b>38</b>	7,0	g	8,6	g	6,5	h	11,1	fg

En cuanto a la concentración de citocinina total ( $\text{ng.ml}^{-1}$  recogido) (Cuadro 3.1) se puede apreciar que la dinámica es similar a la de citocininas totales ( $\text{ng.minuto}^{-1}$ ), con algunas diferencias. No se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ) entre híbridos en los dos primeros estadíos de medición (R3 [-12 DDIA] y R4 [-8 DDIA]). En el híbrido FDD, no se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ) en el período comprendido entre R6 (12 DDIA) y R8 (29 DDIA). Sin embargo la caída se da en el mismo momento, en R6. Respecto al híbrido SG no se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ) entre R5 avanzado (5 DDIA) y R6, ni entre R6 avanzado (16 DDIA) y R8. Además una de las principales diferencias con la dinámica de las citocininas totales ( $\text{ng.minuto}^{-1}$ ) fue la posterior caída que observó en R6 avanzado.

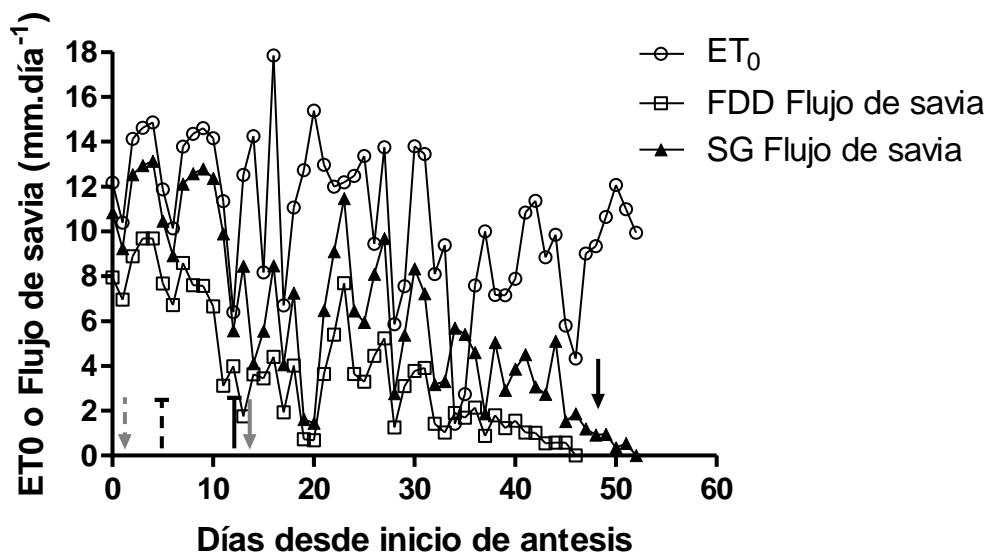
### 3.3.3 Densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) e índice de área foliar verde (IAFV)

Los resultados de las mediciones de la DLRV y del IAFV son los presentados en el Capítulo II Secciones 3.3.2 y 3.3.3 y Figs. 2.2 y 2.3 respectivamente.

### 3.3.4 Flujo de savia xilemática

La dinámica del flujo de savia, y las diferencias entre los híbridos para esta dinámica, se ejemplifican para el Año 1 en la Fig. 3.2. Durante los primeros 10 DDIA, ocurrieron los valores más altos de flujo de savia (entre  $8 \text{ mm.d}^{-1}$  y  $13 \text{ mm.d}^{-1}$ ) en ambos

años (ejemplificado para el primer año en la Fig. 3.2). A partir de 10 DDIA se observó una tendencia negativa en las tasas transpiratorias en ambos híbridos, a pesar de algunos picos que llegaron a los valores máximos que ocurrieron en días con elevada demanda atmosférica en ambos híbridos. Hasta los 17-18 DDIA las variaciones interdiarias en flujo copian los valores de  $ET_0$  (evapotranspiración de referencia). A partir de esa fecha, los valores de flujo tienden a desacoplarse en mayor o menor medida de las fluctuaciones de  $ET_0$ . En promedio de todo el período de medición, el híbrido SG presentó un flujo acumulado de savia 131% superior al híbrido FDD. Dicha diferencia fue cambiando a lo largo del período de medición, y en promedio fue de un 46% entre 0-10 DDIA, de un 123% entre 11-20 DDIA, de un 84% entre 21-30 DDIA y de un 230% entre 31-45 DDIA. Se observa claramente que las diferencias entre los híbridos fueron mayores a partir de 11 DDIA, y que fueron máximas a partir de 31 DDIA demostrando la mayor capacidad de extracción de agua del híbrido SG (Lisanti et al., 2013), comportamiento que se correlaciona con la mayor DLRV de este híbrido (Fig. 2.2).

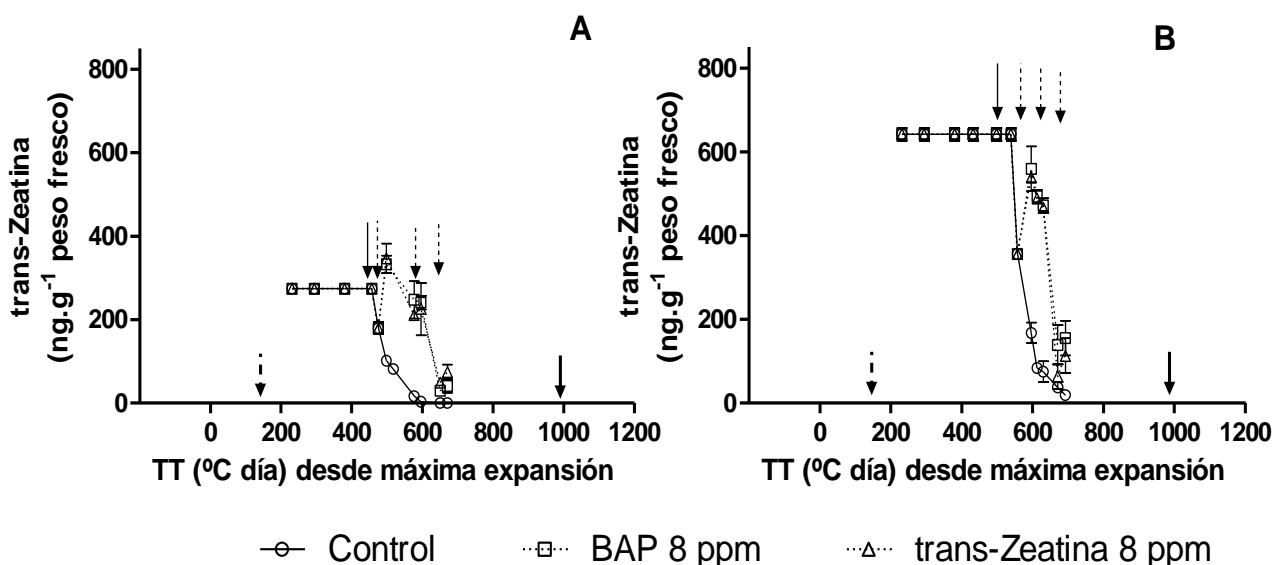


**Fig. 3.2.** Dinámicas de la evapotranspiración de referencia ( $ET_0$ ) y del flujo de savia en los híbridos stay green (SG) y fast dry down (FDD), durante el llenado de frutos. Las flechas cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (gris discontinua), R6 (gris continua), y R9 (negra continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en DLRV en SG y FDD, respectivamente. Cada valor de flujo de savia representa el promedio de las cinco parcelas ( $n = 5$ ). La evapotranspiración de referencia fue estimada con la ecuación de Hargreaves et al. (1985). Datos correspondientes al Año 1.

### 3.3.5 Respuesta a las aplicaciones exógenas de citocininas

En ambos años, la aplicación exógena de citocininas (tanto de BAP como de trans-Zeatina) a la Hoja 17 de ambos híbridos condujo a aumentos o a mantenimientos, con una duración variable, de la concentración de trans-Zeatina en hojas. La Fig. 3.3 ilustra estas respuestas para el Año 1. En la misma se puede observar que tanto en la primera

como en la segunda aplicación los valores endógenos de trans-Zeatina se mantuvieron en promedio o fueron similares a los valores iniciales de los tratamientos control, pero en la tercera aplicación nunca se pudo retrotraer a los valores iniciales; mientras que los tratamientos control cayeron de manera continua desde el inicio de la senescencia foliar. Esto permitió retrasar la caída que se observó en la concentración endógena de trans-Zeatina hasta los 598° Cdía desde máxima expansión de la Hoja 17 en el híbrido FDD y hasta los 622° Cdía desde máxima expansión de la Hoja 17 en el híbrido SG respecto del testigo de cada híbrido. En el momento de la tercera aplicación, los valores de trans-Zeatina endógena de los tratamientos control en relación a los tratamientos bajo aplicaciones exógenas fueron un 98% y un 63% (porcentaje respecto al valor promedio de los tratamientos) menores, FDD y SG respectivamente. En el híbrido SG los valores endógenos de trans-Zeatina en los tratamientos bajo aplicaciones exógenas nunca alcanzaron los valores iniciales del tratamiento control, siendo respecto a ellos un 27% y un 25% (porcentaje respecto al valor promedio de los tratamientos) menores durante el período que corresponde a la primera (556 a 612° Cdía desde máxima expansión) y a la segunda (612 a 671° Cdía desde máxima expansión) aplicación respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre la concentración inicial de trans-Zeatina del tratamiento control respecto a la concentración promedio del período comprendido entre la primera y la segunda aplicación de los tratamientos bajo aplicaciones exógenas. La respuesta a la tercera aplicación de los híbridos fue muy limitada.

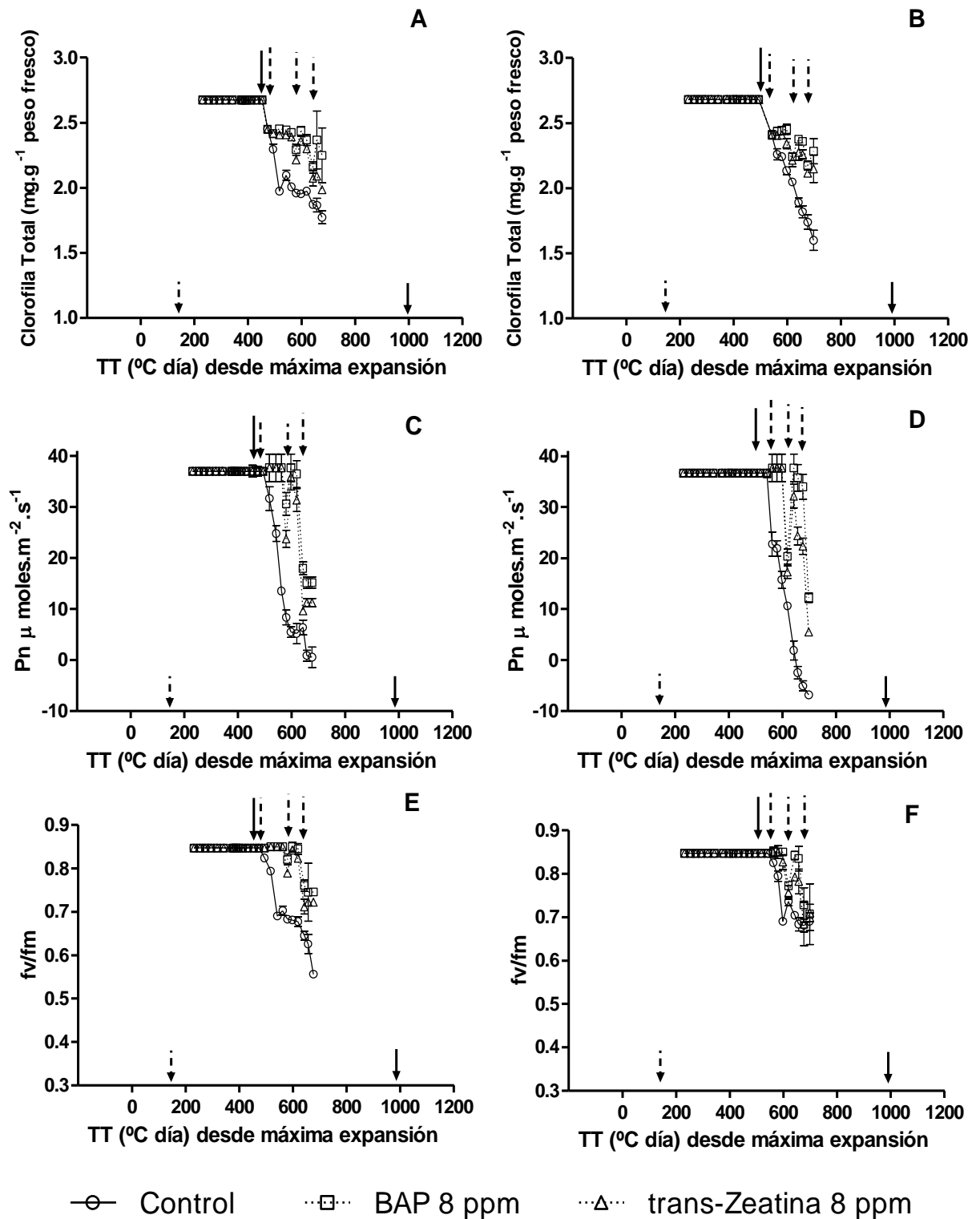


**Fig. 3.3.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina en la hoja 17 en función del tiempo térmico (Tb 4°C) desde la máxima expansión de la hoja, y en respuesta a aplicaciones exógenas de 8 ppm de soluciones de BAP y de trans-Zeatina en los híbridos fast dry down (A) y stay green (B). La flecha continua cercana a la curva indica el momento de inicio de la caída de la concentración de clorofila total del tratamiento control. Las flechas discontinuas cercanas a la curva indican los momentos de aplicación. Las flechas pequeñas cercanas al eje "x" indican el momento de ocurrencia del estadio R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Datos correspondientes al Año 1.

En ambos híbridos, las tres aplicaciones de BAP y las dos primeras aplicaciones de trans-Zeatina tuvieron el efecto de mantener los valores de clorofila total cercanos al 90% de las concentraciones iniciales, observadas antes de que las hojas comenzaran la senescencia. La excepción a esto fue la tercera aplicación con trans-Zeatina en el que los valores fueron inferiores al 90% mencionado (Fig. 3.4). En ambos híbridos, la primera aplicación exógena de ambas formas de citocininas también mantuvo los valores de fotosíntesis neta y de  $F_v/F_m$ , y con la segunda aplicación los valores de estas variables regresaron cerca de los valores de *plateau* previos a la senescencia (Fig. 3.4). Por el contrario, la tercera aplicación tuvo un impacto mucho menor.

Para estimar el valor de umbral de citocininas a partir del cual se desencadenó el proceso de senescencia foliar, se promediaron los valores de trans-Zeatina foliar en el intervalo de tiempo térmico en el que las aplicaciones exógenas de ambas formas de citocininas mantuvieron la concentración de clorofila total, la fotosíntesis neta y  $F_v/F_m$ . Para el híbrido FDD este intervalo fue entre 473 °Cdía y 598 °Cdía desde máxima expansión foliar, y para el híbrido SG el intervalo cubrió el rango entre 542 °Cdía y 622 °Cdía. Para el intervalo de tiempo correspondiente a cada híbrido, se obtuvo un valor de concentración de trans-Zeatina para las dos formas de citocininas aplicadas (BAP y trans-Zeatina). Estos dos valores obtenidos para cada híbrido fueron promediados, para la estimación del umbral que para el híbrido FDD fue de 245 ng.g<sup>-1</sup> de peso fresco y para el híbrido SG fue de 542 ng.g<sup>-1</sup> de peso fresco. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre estas estimaciones del valor umbral y los valores del *plateau* que exhibieron las hojas de la posición 17 de los tratamientos control.





**Fig. 3.4.** Dinámica de la concentración de clorofila total (A, B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C, D) y del rendimiento cuántico máximo de PSII ( $F_v/F_m$ ) (E, F) en la hoja 17, en función del tiempo térmico (Tb 4°C) desde la máxima expansión de la hoja, y en respuesta a aplicaciones exógenas de 8 ppm de soluciones de BAP y de trans-Zeatina, en los híbridos fast dry down (A, C, E) y stay green (B, D, F). La flecha continua cercana a la curva indica el momento de inicio de la caída de la concentración de clorofila total del tratamiento control. Las flechas discontinuas cercanas a la curva indican los momentos de aplicación. Las flechas pequeñas cercanas al eje "x" indican el momento de ocurrencia del estadio R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. (n = 5). Datos correspondientes al Año 1.

### 3.4 Discusión

Las aplicaciones exógenas de citocininas (fitohormonas sintetizadas a nivel de ápices radicales) muestran que en la medida que se mantienen las concentraciones iniciales de citocininas en hojas el inicio del proceso de senescencia se retrasa (Fig. 3.3 y 3.4). Resultados encontrados en otras especies como arroz (Liu et al., 2016), maíz (Ren et al., 2016) y tabaco (Singh et al., 1992) son similares a los hallados en este capítulo, lo que permite incluir al girasol dentro de la lista de especies donde se ha demostrado fehacientemente la participación de las citocininas en el control de la senescencia foliar.

Las respuestas a las aplicaciones exógenas de citocininas han permitido estimar cual podría ser el umbral de citocininas presentes en hojas por debajo del cual se inicia el proceso de senescencia foliar. Dicho valor umbral para la hoja 17 del híbrido FDD fue  $245 \text{ ng.g}^{-1}$  de peso fresco y para el híbrido SG fue  $542 \text{ ng.g}^{-1}$  de peso fresco de trans-Zeatina. Este valor umbral no se diferenció de los valores pre-senescentes (*plateau*) en ambos híbridos. Si extrapolamos este resultado al resto de las posiciones estudiadas, entonces los valores presenescentes (*plateau*) encontrados pueden ser considerados como el valor umbral por debajo del cual se inicia el proceso de senescencia foliar en las mismas. En el híbrido FDD sería 232, 167, 101 y  $93 \text{ ng.g}^{-1}$  de peso fresco para las hojas de las posiciones 20, 22, 24 y 27 respectivamente (Capítulo II, Panel A de las Figs. 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8, respectivamente para cada posición, y Cuadro A1.3 del Apéndice I); y para el híbrido SG sería 705, 694, 806,  $896 \text{ ng.g}^{-1}$  de peso fresco para las hojas de las posiciones 20, 22, 24 y 27 respectivamente (Capítulo II, Panel A de las Figs. 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8, respectivamente para cada posición, y Cuadro A1.3 del Apéndice I). Nadie ha documentado resultados como estos, en híbridos de girasol o en genotipos con patrones de senescencia foliar contrastante de otras especies. El hecho de que los umbrales sean diferentes entre ambos híbridos (mayor en el SG) implica que otros factores están operando en el control de la senescencia. Posiblemente por debajo del umbral de citocininas se produzca la activación o síntesis de los receptores de alguna otra hormona que acelera el proceso de senescencia. Si ello fuera así, es de esperar que el número de receptores necesarios para desencadenar el aceleramiento de la senescencia foliar sea mayor en el híbrido SG que en el FDD.

La dinámica del flujo de savia (Fig. 3.2) muestra una asociación con la disminución en la DLRV (Fig. 2.2, Capítulo II), sobre todo en la primera porción post antesis (hasta los 10-12 DDIA) del período estudiado en la cual el IAFV se mantiene máximo (Fig. 3.2, Capítulo II) tal que la interceptación de la radiación sea mayor que el 95 % (asumiendo un coeficiente de extinción de 0.89, Archontoulis et al., 2011), constituyendo una prueba adicional de una pérdida de funcionalidad del sistema radical. Esto explicaría las diferencias entre ambos híbridos, asumiendo que la conductancia foliar es similar en ambos. En la caída posterior juegan la reducción de IAFV, la cual es mayor en FDD, y la reducción progresiva de la demanda (Fig. 3.2). La caída en las cantidades de citocininas totales recogidas de los tallos seccionados (Fig. 3.1) probablemente constituya un reflejo adicional de esa pérdida de funcionalidad radical. Esa menor síntesis de citocininas se ve reflejada en la caída de la cantidad de las mismas recogidas en el fluido xilemático a partir de fin de antesis (Fig. 3.1), lo que nos lleva a plantear que ello afecta la concentración de citocininas en hojas disminuyéndola y provocando el inicio de la senescencia foliar (Fig. 3.1 y Fig. 2.3 del Capítulo II, en la cual se encuentra marcado el inicio de la senescencia en las distintas posiciones foliares estudiadas). Llama la atención la menor cantidad de citocininas totales recogidas en el

fluido xilemático en pre-antesis. En función de ello, se construyó un índice que relacionó a la concentración de citocinina total ( $\text{ng.ml}^{-1}$  recogido en el período de observación) con la DLRV, a fin de utilizarse como indicador potencial de la actividad del sistema radical presente. Claramente se observa en el Cuadro 3.2 que este índice se dispara en antesis, precisamente en 0 y 5 DDIA en FDD y en 0, 5 y 12 DDIA en SG coincidente con los máximos de citocininas totales ( $\text{ng.minuto}^{-1}$ ) recogidas (Fig. 3.1) y con las máximas concentraciones de citocininas totales ( $\text{ng.ml}^{-1}$  recogido) (Cuadro 3.1). Esto podría ser explicado por la capacidad de sintetizar citocininas que tienen las raíces, ya que el volumen recogido es relativamente estable durante las mediciones iniciales. Posiblemente la antesis produzca una señal que afecte la capacidad de síntesis de las raíces, o que durante la misma se produzca un incremento de raíces jóvenes que tengan una elevada tasa de síntesis de citocininas.

**Cuadro 3.2.** Relación entre la concentración de citocinina total y la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) en cada momento de observación, expresado en días desde el inicio de antesis (DDIA) para un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG). Cada valor corresponde al promedio de cinco observaciones ( $n = 5$ ). Resaltado en gris se encuentran aquellos momentos y valores para los cuales no se contaba con una observación de DLRV y se utilizó las funciones ajustadas (FDD:  $Y = 0,3434 + [0,004456 \cdot X]$ ; SG:  $Y = 0,4187 + [0,004692 \cdot X]$ ) para estimarlos. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre híbridos y momentos de medición. Se encuentran excluidos del análisis los momentos para los cuales los valores fueron estimados. Datos correspondientes al Año 1.

DDIA	Relación citocinina total ( $\text{ng. ml}^{-1}$ recogido)/DLRV			
	FDD		SG	
-12	22,6		21,9	
-8	31,3	hi	26	i
-4	29,8		67,7	
0	100,3	e	115,3	c
5	109,7	d	163,2	a
12	45	g	153,7	b
16	47,3		59,9	
29	45,3	g	72,7	f
38	28,6	i	36,7	h

No existen antecedentes en la bibliografía en los que se hayan reportado resultados similares a estos en las que todas estas variables fueran consideradas en forma conjunta. En sorgo, Ambler et al. (1992) demostraron que un genotipo de senescencia retardada tenía una mayor concentración de citocininas en la savia del xilema, pero a diferencia de nuestro trabajo no establecieron relación alguna con el sistema radical y no estudiaron dichas dinámicas durante todo el período de llenado de frutos y los 12 días previos a antesis. En girasol, Bano et al. (1994) y Shashidhar et al. (1996) encontraron que bajo condiciones de sequía la concentración de citocininas en el fluido xilemático disminuye, y que esto repercute en la aceleración de la senescencia foliar (Lisanti et al., 2013). Sin embargo, a diferencia de este trabajo tampoco realizaron mediciones, durante el período de llenado de frutos y los 12 días previos a antesis, que relacionen la DLRV con las cantidades de citocininas particionadas hacia la parte aérea,

con la concentración de citocininas a nivel foliar y como todo ello se vincula con la senescencia foliar. Los resultados de este capítulo son los primeros en el seguimiento de la dinámica de las citocininas en savia xilemática durante todo el llenado de frutos y los 12 días previos a antesis, tanto en girasol como en otras especies.

Las diferencias entre los híbridos con distinto patrón de senescencia (SG y FDD), respecto a la concentración inicial de citocininas en hojas e inicio del proceso de senescencia, se pueden explicar en gran parte a través de las diferencias halladas a nivel de la dinámica de DLRV en función de la ontogenia (Fig. 2.2, Capítulo II). Lisanti et al. (2013) encontraron resultados similares respecto a las diferencias en la DLRV, trabajando con otro par de híbridos SG y FDD. Los mayores valores de DLRV encontrados en el híbrido SG (Fig. 2.2, Capítulo II), y para el IAFV (Fig. 2.3, Capítulo II) se reflejan en que los mismos tengan un mayor flujo xilemático hacia la parte aérea (Fig. 3.2), lo que conjuntamente con la mayor cantidad de citocininas recogidas en el período de observación (Fig. 3.1) y con la mayor concentración de citocininas por ml recogido (Cuadro 3.1) hacen que las hojas del híbrido SG reciban cantidades muy elevadas de citocininas respecto del FDD. Nadie ha informado resultados como estos, en híbridos de girasol o en genotipos con patrones de senescencia foliar contrastante de otras especies.

Las concentraciones de citocininas en la parte aérea, están íntimamente relacionadas con lo que ocurre en el sistema radical. Se ha demostrado que la DLRV (Fig. 2.2, Capítulo II) disminuye a partir del fin de antesis (coincidente con Lisanti et al., 2013) y que esa disminución tiene un fuerte impacto sobre la actividad del sistema radical. Esto va acompañado de la disminución en la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático ( $\text{ng} \cdot \text{minuto}^{-1}$ ) recogidas en los distintos períodos de observación (Fig. 3.1). El inicio de la senescencia radical es previo al inicio de la senescencia foliar (ver Capítulo II Fig. 2.2 DLRV y Fig. 2.3 IAFV, y Lisanti et al., 2013). Ello sugiere (o es compatible con) la existencia de una comunicación de carácter orgánico entre el sistema radical y la parte aérea, y nuestros resultados muestran evidencia de que las citocininas pueden ser las responsables de dicha comunicación.

Los resultados planteados hasta aquí sugieren un modelo que permite explicar la participación de las citocininas en el proceso de senescencia foliar y además el origen de las diferencias observadas entre híbridos con diferentes patrones de senescencia foliar SG o FDD. Si este modelo es correcto permitirá explicar que ocurre cuando se producen variaciones en las relaciones fuente/destino que modifican la partición de los hidratos de carbono asimilados y como ello puede generar variaciones en la DLRV. En el próximo capítulo, se presentarán los resultados que muestran dicho efecto, durante el período de llenado de frutos en ambos híbridos, y permiten analizar si se producen o no cambios en el inicio del proceso de senescencia foliar.

## **Capítulo IV**

### **Efecto de la alteración en la partición de los hidratos de carbono entre los órganos de la planta sobre la senescencia foliar**

## Capítulo IV

# Efecto de la alteración en la partición de los hidratos de carbono entre órganos de la planta sobre la senescencia foliar

## 4.1 Introducción

Se sabe que el cese del crecimiento vegetativo seguido por la floración y la fructificación, provoca cambios importantes en el metabolismo de las plantas, particularmente en la redistribución y partición de nutrientes y fotoasimilados, ya que el crecimiento de los frutos representa un destino prioritario que compite por nutrientes y fotoasimilados con el resto de los órganos de la planta (Noodén y Guiamet 1989). Hay una escuela de opinión que percibe la fructificación como el proceso responsable de desencadenar la senescencia foliar, fundamentalmente porque buena parte del nitrógeno foliar se retransloca a los frutos (Sinclair y de Wit, 1976, soja; Sinclair y Horie, 1989, soja arroz y maíz; Van Oosterom et al., 2010, sorgo), aunque el nitrógeno no parece ser el único factor involucrado en la senescencia (Noodén et al., 1997, soja). Henzell y Gillieron (1973) hallaron, en sorgo (*Sorghum bicolor* L.) bien regado, que la tasa de senescencia disminuye tras la remoción de la panoja. En consonancia con la noción de que la exportación de nitrógeno de la hoja al fruto es el factor desencadenante de la senescencia foliar, en trigo (*Triticum aestivum* L.) la eliminación de la espiga provocó un retraso en la senescencia de las hojas (Srivalli et al., 2009) y promovió el crecimiento radical (Richards et al., 2007). Noodén et al. (1990) encontraron que al remover los frutos, la concentración de ribósidos de dihidrozeatina en el fluido xilemático de soja (*Glycine max* L.) aumentó 5 veces, la de ribósidos de zeatina 2 veces y, la de zeatina también aumentó pero en menor grado. En base a esto sugirieron que las vainas pueden deprimir la producción de citocininas a nivel radical, respuesta que relacionaron con la senescencia monocárpica de soja, pero no establecieron una relación clara y directa con la funcionalidad del sistema radical, ni tampoco establecieron que la misma antecede a la senescencia foliar. Esto refuerza nuestra idea básica expuesta en capítulos anteriores, sobre el desencadenante de la senescencia foliar. La misma señala a las raíces como responsables, ya que a partir de anthesis la senescencia radical se incrementa junto con el detrimento en la funcionalidad del sistema radical y la consecuente reducción de la síntesis de citocininas que se particionan a la parte aérea.

En base a los resultados y conclusiones obtenidos de los Capítulos II y III (raíces como responsables en la determinación del inicio de la senescencia foliar mediado por variaciones en los niveles de citocininas en el fluido xilemático), en este capítulo se realizaron experimentos con el objetivo de alterar la partición de hidratos de carbono hacia el sistema radical, y evaluar su efecto sobre la senescencia foliar. La hipótesis que sustenta este objetivo es que las alteraciones en el coeficiente de partición de hidratos de carbono a favor del sistema radical, provocarán un incremento en el crecimiento del mismo y como consecuencia de ello se incrementará la cantidad de citocininas en el fluido xilemático y a nivel de hoja, retrasando el inicio del proceso de senescencia foliar. No hay ningún precedente en la literatura, tanto en girasol o en cualquier otra especie de cultivo, de estudios que hayan intentado documentar el efecto combinado de la alteración en la partición de hidratos de carbono hacia las raíces sobre el crecimiento del sistema radical y la cantidad de citocininas en el fluido xilemático. Asimismo se

desconoce el efecto de este tipo de manipulación sobre los umbrales de citocininas en hojas por debajo de los cuáles se inicia la senescencia foliar.

## 4.2 Materiales y Métodos

### 4.2.1 Diseño experimental y condiciones de cultivo

Los experimentos se llevaron a cabo en la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (34 ° 35'S, 58 ° 29'W) durante dos campañas de cultivo (2012/13 y 2013/14). Los ensayos son los mismos del Capítulo II, por lo tanto en la sección 2.2.1 se pueden ver las fechas de siembra, híbridos, densidades, condiciones de crecimiento, datos de la dinámica de la fenología, y de las variables ambientales. A partir del estadio ontogénico de R4 (comienzo de apertura de la inflorescencia, Schneiter y Miller 1981) se procedió a quitar de los capítulos la totalidad de los primordios florales (-F) en ambos híbridos, SG y FDD, con el objetivo de eliminar los frutos que son los destinos prioritarios de fotoasimilados durante el llenado de los mismos (Hall et al., 1989). De este modo quedaron definidos cuatro tratamientos: 1) SG Control; 2) SG -F; 3) FDD Control y 4) FDD -F. Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas con cinco repeticiones. Cada una de las cinco parcelas principales contenían cuatro sub-parcelas, una para cada combinación de híbrido (SG y FDD) por tratamiento (control y desgranado -F). El tamaño de cada sub-parcela era de seis hileras de 4.5 m, espaciadas a 0.65 m entre hileras, la distancia entre plantas fue de 0.20 m y la densidad utilizada fue de 7.5 plantas.m<sup>-2</sup>.

### 4.2.2 Variables de respuesta

Se realizaron mediciones de densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV), del índice de área foliar verde (IAFV), y de las variables de hoja: concentración de clorofila total, fotosíntesis neta, rendimiento cuántico máximo del PSII y concentración de trans-Zeatina; siguiendo la metodología descrita en Materiales y métodos del Capítulo II, Sección 2.2. Además, se realizaron mediciones de la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático (ng.minuto<sup>-1</sup>) recogidas en el período de observación, siguiendo con el procedimiento descrito en Materiales y métodos del Capítulo III, Sección 3.2.

Además de registrar la dinámica de la DLRV, se utilizó una técnica descriptiva para monitorear con más detalle la dinámica de la respuesta a nivel de cultivo del sistema radical de los tratamientos desgranados respecto de los tratamiento control para ambos híbridos, utilizando minirrhizotrones (tubos de acrílico transparente de 2 metros de longitud, con un diámetro externo e interno de 50 mm y 44 mm respectivamente) (Fig. A.3.1, Apéndice III). El número de minirrhizotrones fue de dos por sub-parcela (híbrido, con/sin remoción de flores) y los mismos se enterraron por debajo y en forma paralela al surco de siembra. Los agujeros de acceso para la colocación de los tubos se realizaron con un barreno y con ayuda de un soporte que permitió lograr un ángulo de 30° con respecto a la vertical. Este ángulo de inserción, permitió alcanzar una profundidad de 170 cm y abarcar 1 metro lineal de surco. El extremo inferior del tubo fue sellado para evitar la entrada de agua, mientras que el extremo superior se mantuvo tapado para evitar la entrada de agua, insectos o suciedad que pueda afectar el correcto

funcionamiento del sistema. Una cámara Web (Facecam 320x, Genius, Taiwan) que permitía sacar fotos se instaló sobre un extremo de un tubo de aluminio de 2.5 metros de largo para acceder a la totalidad del tubo acrílico. La cámara se conectaba a una computadora portátil que permitía la previsualización de las imágenes antes de capturarlas. Para acceder siempre a la misma posición en el tubo de acrílico, se realizaron marcas en el tubo de aluminio, que permitieron la toma de imágenes cada 10 cm de profundidad repetidas en el tiempo. En cada profundidad de medición se procedió a la toma de tres imágenes, una dirigida hacia la vertical, y las otras dos a 60° a la derecha e izquierda de la misma, lo que permitió aumentar las probabilidades de encontrar raíces en cada estrato del perfil. Para lograr un adecuado seguimiento de la dinámica radical, se procedió a tomar imágenes 2 veces por semana. Con las imágenes obtenidas, en este capítulo se presentan secuencias representativas de imágenes del proceso de senescencia radical (las raíces vivas presentan color blanco y a medida que van senesciendo cambian a distintas tonalidades de marrón por la suberización de los tejidos [Majdi et al., 2001; Vamerali et al., 2003]), en ambos híbridos en tres estratos del suelo (0-60 cm, 60-120 cm y de 120 a 170 cm).

### **4.2.3 Análisis estadístico**

Para las variables de respuesta DLRV, IAFV, concentración de clorofila total, fotosíntesis neta, fluorescencia y concentración de trans-Zeatina de la hoja, se utilizó la misma metodología de análisis que la descrita en el Capítulo II, sección 2.2.3. Respecto a los análisis estadísticos de la variable cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático ( $\text{ng} \cdot \text{minuto}^{-1}$ ) recogidas en el período de observación, se realizaron siguiendo la metodología detallada en el Capítulo III, sección 3.2.3.

## **4.3 Resultados**

### **4.3.1 Interacción Híbrido-Tratamiento-Año**

No se encontraron interacciones significativas ( $p > 0.05$ ) de híbrido por tratamiento por año, híbrido por año, ni tratamiento por año, para los coeficientes de las funciones bi-lineales ajustadas a las dinámicas de DLRV, del IAFV, de la fotosíntesis neta, de la fluorescencia, y de la concentración de clorofila total y de trans-Zeatina en hoja (Cuadros A3.1, A3.3 y A3.4, Apéndice III). Tampoco se encontraron interacciones significativas ( $p > 0.05$ ) entre híbrido por tratamiento por año, híbrido por año, ni tratamiento por año para la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático ( $\text{ng} \cdot \text{minuto}^{-1}$ ) recogidos en el período de observación (Cuadro A3.2, Apéndice III).

Los datos de la dinámica de la fenología, y los valores de las variables ambientales durante los ensayos correspondientes a los dos años son los informados en el Capítulo II Sección 2.3.1. Las condiciones ambientales durante el período de medición fueron similares entre los híbridos en el mismo año y entre años dentro de cada híbrido (Fig. A1.1, Apéndice I).

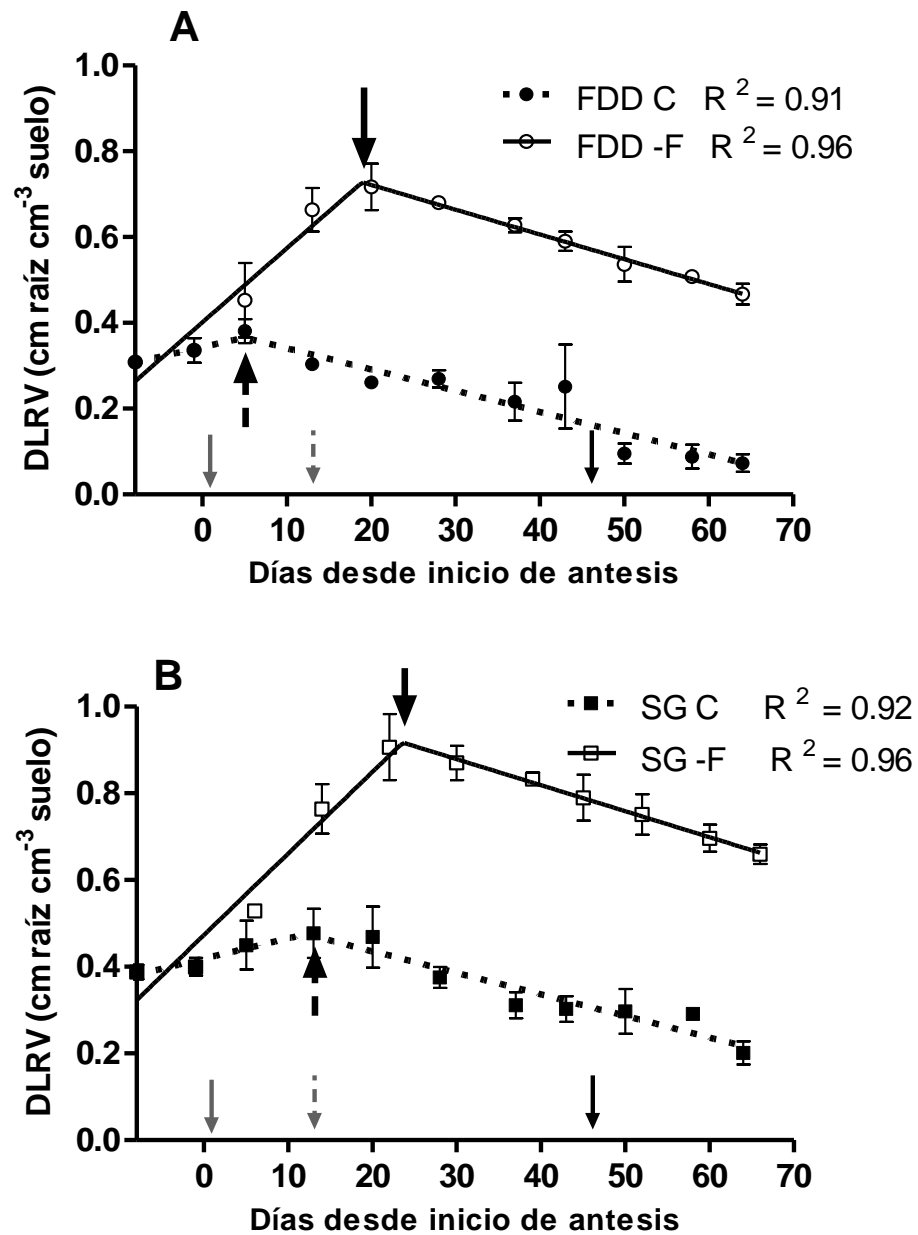
En base a estas concordancias generales de los patrones de respuesta de las variables medidas dentro de cada tratamiento entre años, las tasas de desarrollo de los cultivos de cada uno de los híbridos, y la similitud de las condiciones ambientales



durante el llenado de frutos a través de los años y de los híbridos, en lo que sigue y con el objeto de simplificar, se presentan los datos de un solo año para ilustrar las respuestas observadas.

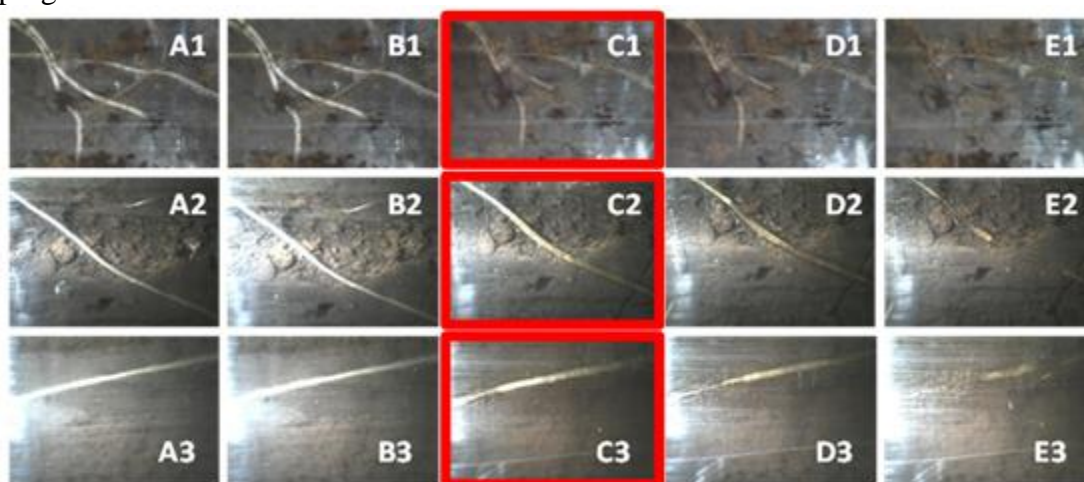
#### **4.3.2 Densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV)**

Las muestras de raíces correspondientes a los estratos de suelo de 0-20 cm, 20-40 cm y 40-60 cm mostraron evoluciones de DLRV con tendencias similares, por lo que se muestran los valores agrupados del estrato de 0 a 60 cm (Fig. 4.1). Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento control y el desgranado dentro de cada híbrido en el momento del cambio en la pendiente de la DLRV (inicio de la senescencia radical), lo que implicó un retraso, respecto de sus controles, en el inicio de la caída de la DLRV de 14 días en el híbrido FDD, y de 12 días en el SG (Cuadro A3.4, Apéndice III). Los valores máximos de DLRV fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores en los tratamientos desgranados en relación a los controles; en un 88% en FDD, y en un 90% en SG. Desde el momento en que se alcanzaron los valores máximos en la DLRV, las tasas de disminución de esta variable no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos dentro de cada híbrido. Es importante destacar que este patrón de respuesta significó que los tratamientos desgranados en ambos híbridos mostraran valores de DLRV mayores durante toda la fase de llenado de frutos, y que la diferencia entre los tratamientos en ambos híbridos sea proporcionalmente mayor a medida que avanzaba la fase de llenado de frutos (Fig. 4.1). Por lo tanto, los valores de DLRV a 50 DDIA (unos días después de R9) fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores en el tratamiento desgranado para ambos híbridos, 460% en el FDD y 153% en el SG.

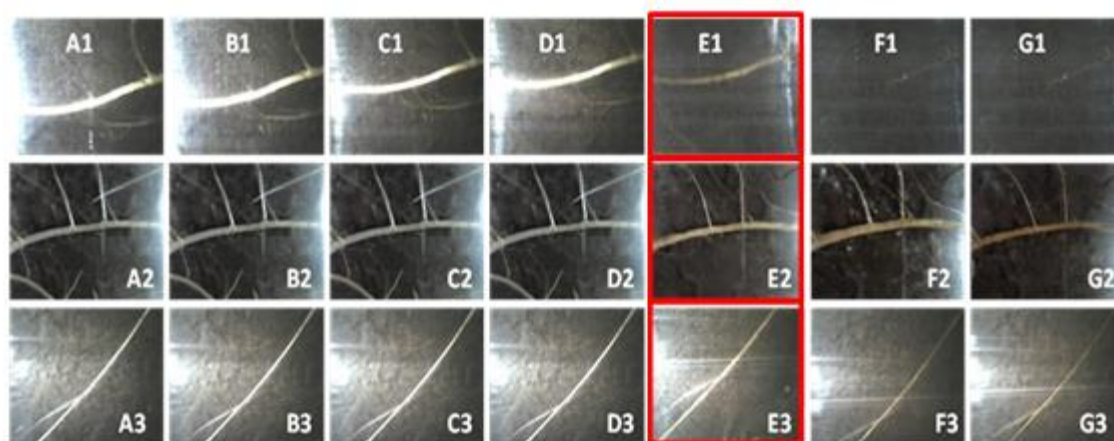


**Fig. 4.1.** Dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) en el estrato de 0-60 cm del suelo, en los híbridos fast fry down (FDD, A) y stay green (SG, B) durante el llenado de frutos, para los tratamientos control (C) y desgranado (-F). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Las flechas verticales continuas y discontinuas con trazo amplio y cerca de las funciones ajustadas, indican el tiempo en el que los tratamientos -F y C, respectivamente, alcanzaron los picos de valores máximos de DLRV. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (gris continua), R6 (gris discontinua) y R9 (negra continua). Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. (n = 5). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III.

En las Figs. 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5 se muestran las secuencias de la senescencia radical y las diferencias visuales entre tratamientos y genotipos usando imágenes registradas para posiciones fijas dentro de los estratos indicados. El momento de inicio de la caída de la DLRV (inicio de senescencia radical) (Fig. 4.1) en los controles de ambos híbridos, coinciden con los cambios en el color de las raíces, que en los tres estratos presentados ocurren a los 6 DDIA en el FDD (Fig. 4.2 C1, C2 y C3), y a los 12 DDIA en el SG (Fig. 4.3, E1, E2, y E3). Se puede observar en las Figs. 4.2 y 4.3 que en el estrato superior (1) el cambio de color de raíces fue de una tonalidad entre el blanco y el marrón, y que en los dos estratos inferiores (2 y 3) se observa un cambio de dos tonalidades (blanco pardo y crema, respectivamente) luego del blanco hasta llegar al marrón característico de senescencia completa de la imagen, lo que indicaría pérdida progresiva de la funcionalidad radical.

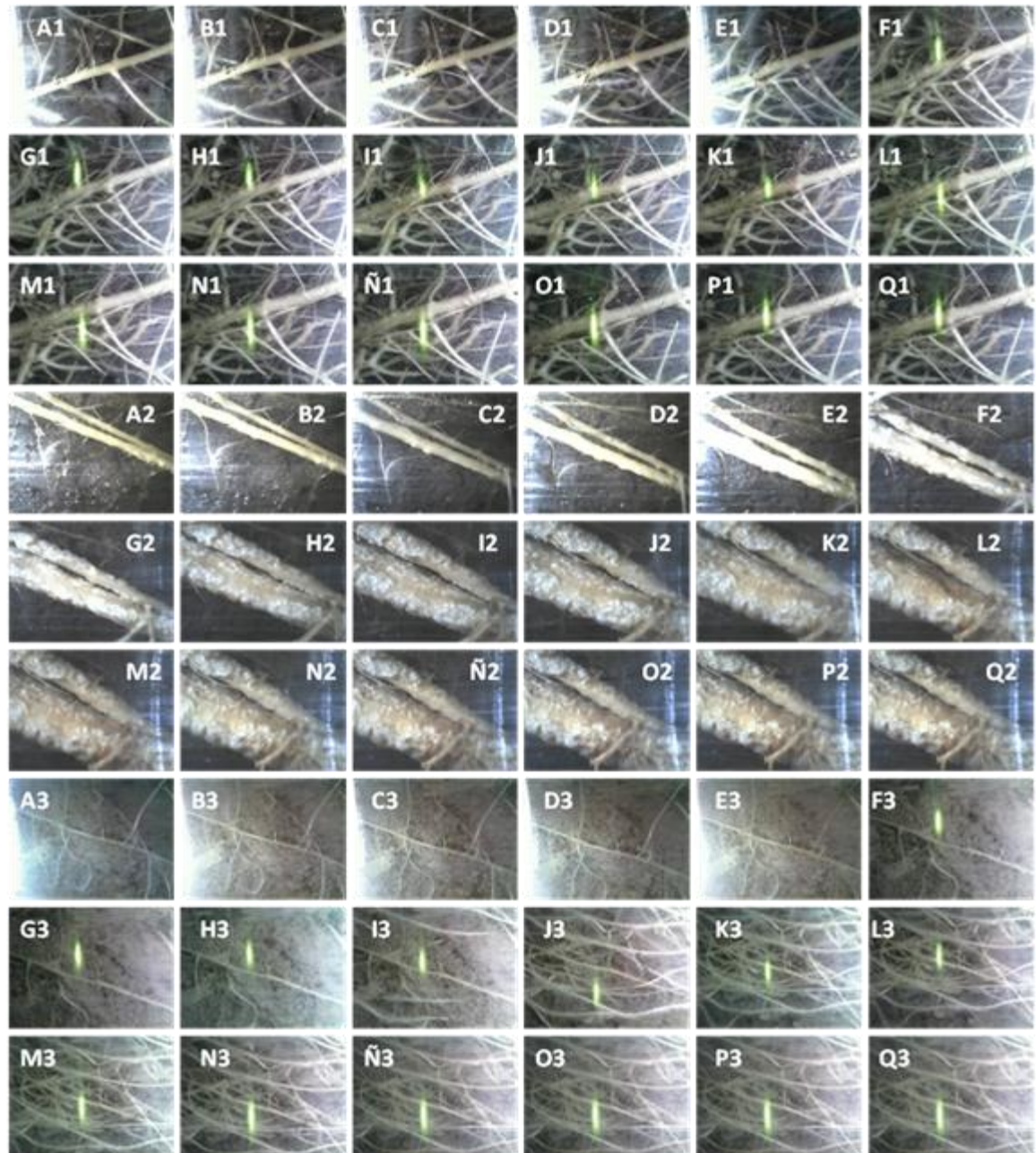


**Fig. 4.2.** Imágenes de las raíces obtenidas en el tratamiento control del híbrido fast dry down, a los 0 (A), 3 (B), 6 (C), 9 (D) y 12 (E) días desde el inicio de antesis para las profundidades 0-60 cm (1), 60-120 cm (2) y 120-170 cm (3). Recuadros rojos indican el momento de inicio de la senescencia radical. Imágenes correspondientes al año 1.



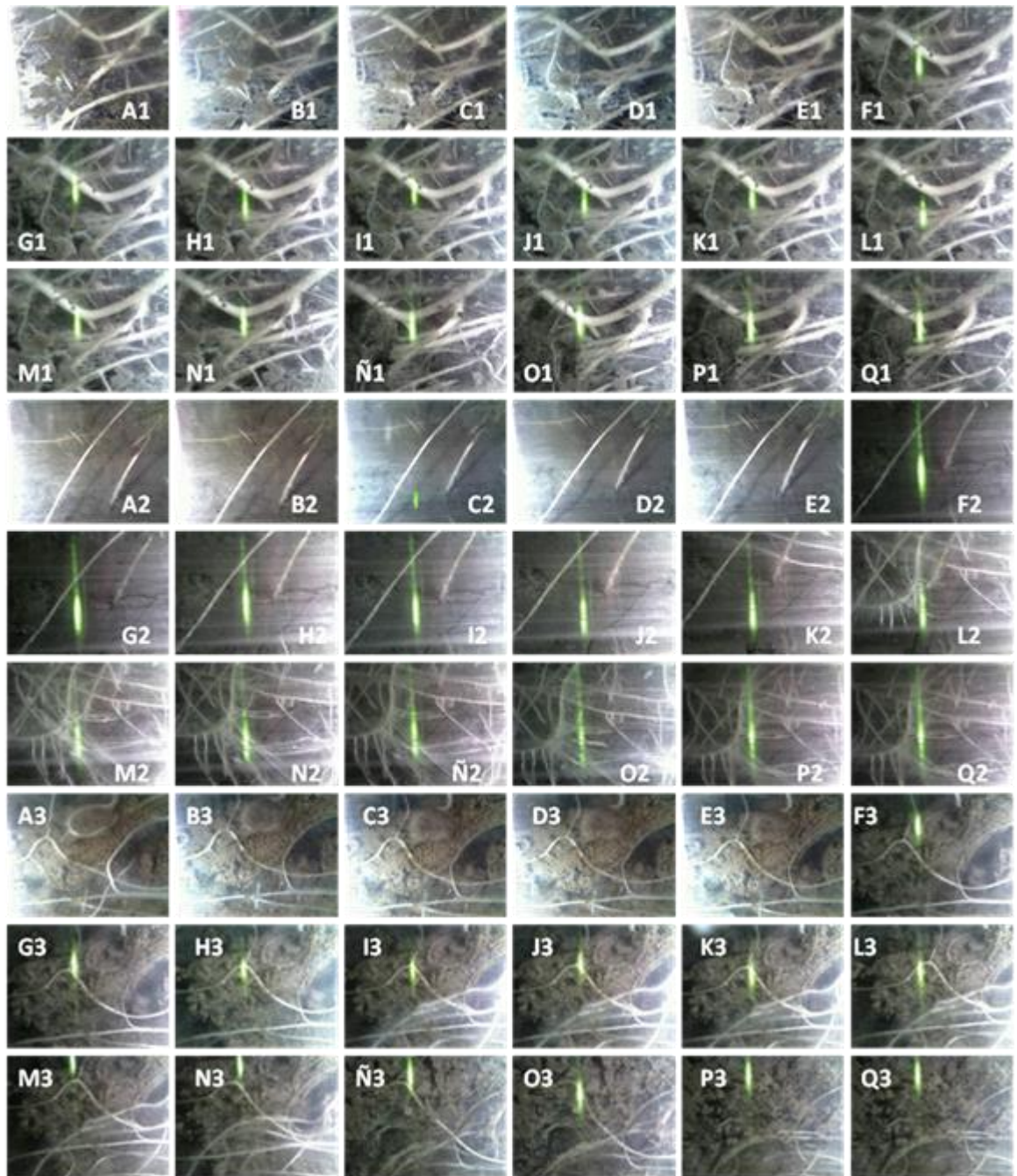
**Fig. 4.3.** Imágenes de las raíces obtenidas en el tratamiento control del híbrido stay green, a los 0 (A), 3 (B), 6 (C), 9 (D), 12 (E), 15 (F) y 18 (G) días desde el inicio de antesis, para las profundidades 0-60 cm (1), 60-120 cm (2) y 120-170 cm (3). Recuadros rojos indican el momento de inicio de la senescencia radical. Imágenes correspondientes al Año 1.

Respecto del efecto del desgranado sobre el sistema radical, es de suma importancia remarcar que en ambos híbridos y en todos los estratos, los tratamientos desgranados presentaron una gran proliferación de raíces nuevas, mayor engrosamiento radical y retraso en el inicio de la senescencia de las raíces (mantenimiento del color blanco) (Fig. 4.4 y 4.5). Esto estaría indicando altos niveles de funcionalidad radical coincidente con los altos niveles en la DLRV (Fig. 4.1). No se pudieron apreciar cambios de coloración en las secuencias presentadas para ambos híbridos, manteniéndose blancas las raíces durante todo el período de medición.



**Fig. 4.4.** Imágenes de las raíces obtenidas en el tratamiento desgranado del híbrido fast dry down, a los 0 (A), 5 (B), 12 (C), 17 (D), 22 (E), 28 (F), 33 (G), 38 (H), 43 (I), 48 (J), 52 (K), 58 (L), 63 (M), 67 (N), 75 (Ñ), 79 (O), 80 (P) y 84 (Q) días desde el inicio de antesis, para las profundidades 0-60 cm (1), 60-120 cm (2) y 120-170 cm (3). Imágenes correspondientes al Año 1.



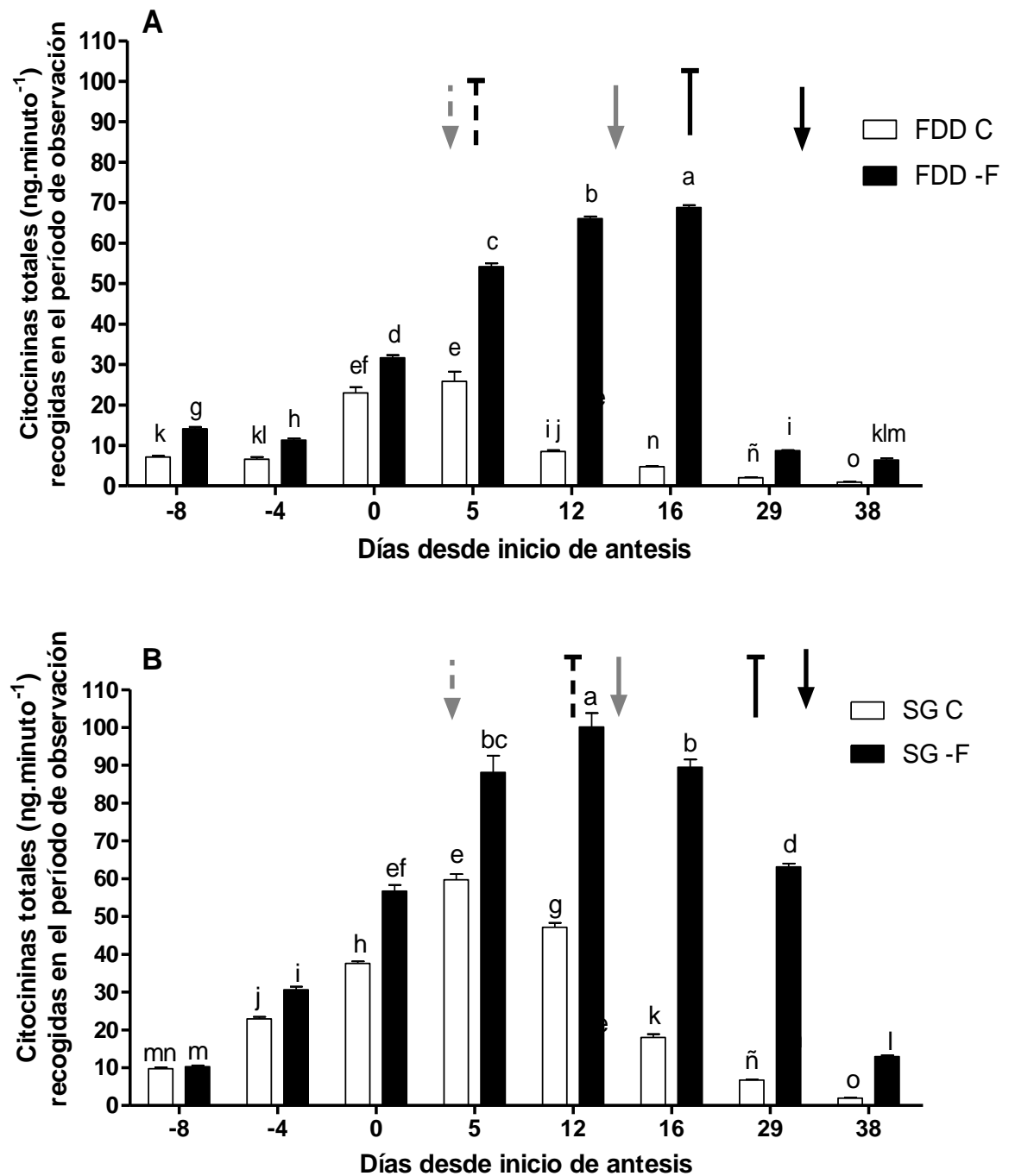


**Fig. 4.5.** Imágenes de las raíces obtenidas en el tratamiento desgranado del híbrido stay green, a los 0 (A), 5 (B), 12 (C), 17 (D), 22 (E), 28 (F), 33 (G), 38 (H), 43 (I), 48 (J), 52 (K), 58 (L), 63 (M), 67 (N), 75 (Ñ), 79 (O), 80 (P) y 84 (Q) días desde el inicio de antesis, para las profundidades 0-60 cm (1), 60-120 cm (2) y 120-170 cm (3). Imágenes correspondientes al Año 1.

### 4.3.3 Cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogidas en el período de observación

La dinámica de la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático ( $\text{ng} \cdot \text{minuto}^{-1}$ ) recogidas en el período de observación, y las diferencias en la misma entre los tratamientos en cada híbrido, se ejemplifican para el Año 1 en la Fig. 4.6. En ambos híbridos, el tratamiento desgranado presentó valores significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores en todos los estadios fenológicos medidos en comparación con el control, a excepción de R4 (-8 días desde inicio de antesis) en el híbrido SG donde no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos. Dichas diferencias en favor de los tratamientos desgranados fueron, en promedio de todos los estadios fenológicos medidos, de un 255% y de un 121% en FDD y SG respectivamente, respecto de los tratamientos control. En los dos híbridos, se observó que la dinámica entre ambos tratamientos es diferente. La cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático ( $\text{ng} \cdot \text{minuto}^{-1}$ ) en los controles se incrementó hasta los 5 DDIA en ambos híbridos, y a partir de estos momentos cayó significativamente ( $p < 0.05$ ). Es importante y oportuno reiterar lo señalado en el Capítulo III, Sección 3.3.2, respecto a que a pesar de la caída significativa para el tratamiento control del híbrido SG en R6, la misma solo fue del 21% y que recién en el estadio avanzado de R6 (16 DDIA) se apreció la mayor caída en la cantidad de citocininas totales recogidas, lo cual coincide con la caída de la DLRV (Fig. 4.1 B). En los tratamientos desgranados, la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático ( $\text{ng} \cdot \text{minuto}^{-1}$ ) en el híbrido FDD se incrementó hasta los 16 DDIA para posteriormente caer 87% en R8 (29 días desde el inicio de antesis,  $p < 0.05$ ). En el híbrido SG se incrementaron hasta los 12 DDIA, cayendo de manera significativa en un 10% a los 16 DDIA y en un 29% a los 29 DDIA. Si bien estas caídas son significativas, los valores se mantienen en niveles similares a los previos al máximo, y cayeron de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en un 80% en un estadio avanzado de R8 (38 días desde el inicio de antesis). En ambos híbridos, estas dinámicas coinciden con la dinámica de la DLRV, tanto en el tratamiento control como en el desgranado (Fig. 4.1 A y B), lo que indica que están asociadas positivamente ( $p < 0.05$ ). Respecto al volumen recogido (ml) (Cuadro 4.1) el promedio entre R4 (-8 DDIA) y R8 (38 DDIA) para el híbrido FDD fue de 25 ml y de 35 ml control y desgranado respectivamente; y para el híbrido SG fue de 32 ml y de 41 ml control y desgranado respectivamente. El volumen recolectado disminuyó hacia R8 para el híbrido FDD en un 77% y en un 66% control y desgranado respectivamente; y para el híbrido SG en un 74% y en un 55% control y desgranado respectivamente. En relación al volumen promedio recolectado en el período comprendido desde R4 (-8 DDIA) hasta R6 (12 DDIA), para el híbrido FDD fue de 33.6 ml y de 43.4 ml control y desgranado, respectivamente, y para el híbrido SG fue de 41 ml y 50 ml control y desgranado, respectivamente. Estas diferencias en el volumen de fluido xilemático recogido entre los tratamientos en ambos híbridos, refleja las diferencias observadas en la DLRV (Fig. 4.1). La cantidad de citocininas totales ( $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  recogido) fue significativamente superior en todos los períodos de medición en los tratamientos desgranados en relación a los controles en ambos híbridos (a excepción de R4 [-8 DDIA] en el híbrido SG, donde no se encontraron diferencias entre los tratamientos). Dicha variable se incrementó en los tratamientos controles de ambos híbridos hasta los 5 DDIA. En el híbrido FDD a partir de este momento se produjo la caída de la misma ( $p < 0.05$ ). En cambio en el híbrido SG este valor se mantuvo una semana para luego caer ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 4.1 A y B). En los tratamientos desgranados la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático se incrementó hasta los 16 DDIA en ambos híbridos. En el híbrido FDD a partir de este momento se produjo la

caída de la misma ( $p < 0.05$ ). En cambio en el híbrido SG este valor se mantuvo una semana para luego caer ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 4.1 A y B).



**Fig. 4.6.** Dinámica de la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogido en los híbridos fast dry down (FDD, A) y stay green (SG, B) para los tratamientos control (C) y desgranado (-F) durante el llenado de frutos. La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo III. Las flechas indican los estadios fenológicos R5.1 (gris discontinua), R6 (gris continua) y R8 (negra continua). Las líneas verticales negras continuas y discontinuas coronadas indican el comienzo de la caída en la DLRV en -F y C, respectivamente. Las líneas coronadas asociadas a cada barra indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Letras diferentes, por encima de cada barra, indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos (C y -F) y días desde inicio de antesis, para cada híbrido. Datos correspondientes al Año 1.

**Cuadro 4.1.** Volumen recogido y concentración de citocinina total en cada momento de observación expresado en días desde el inicio de antesis (DDIA) para el tratamiento control (C) y desgranado (-F), en un híbrido fast dry down (FDD, A) y otro stay green (SG, B). Cada valor corresponde al promedio de cinco observaciones (n=5). En cada variable, letras diferentes dentro de cada híbrido indican diferencias significativas entre tratamientos y momentos de medición ( $p < 0.05$ ). Datos correspondientes al Año 1.

**A**

DDIA	Volumen recogido (ml)				Concentración de citocinina total (ng.ml <sup>-1</sup> )			
	FDD C		FDD -F		FDD C		FDD -F	
-8	37,0	b	41,8	ab	9,6	j	12,7	i
-4	34,9	bc	41,1	ab	9,4	j	13,8	i
0	34,1	bc	42,5	ab	33,7	g	48,7	e
5	31,0	c	45,6	a	41,7	f	59,4	d
12	31,0	c	46,0	a	13,7	i	71,8	c
16	19,3	d	31,0	c	12,3	i	83,9	a
29	8,3	e	15,8	d	12,4	i	75,4	b
38	7,0	e	13,7	de	6,5	k	23,3	h

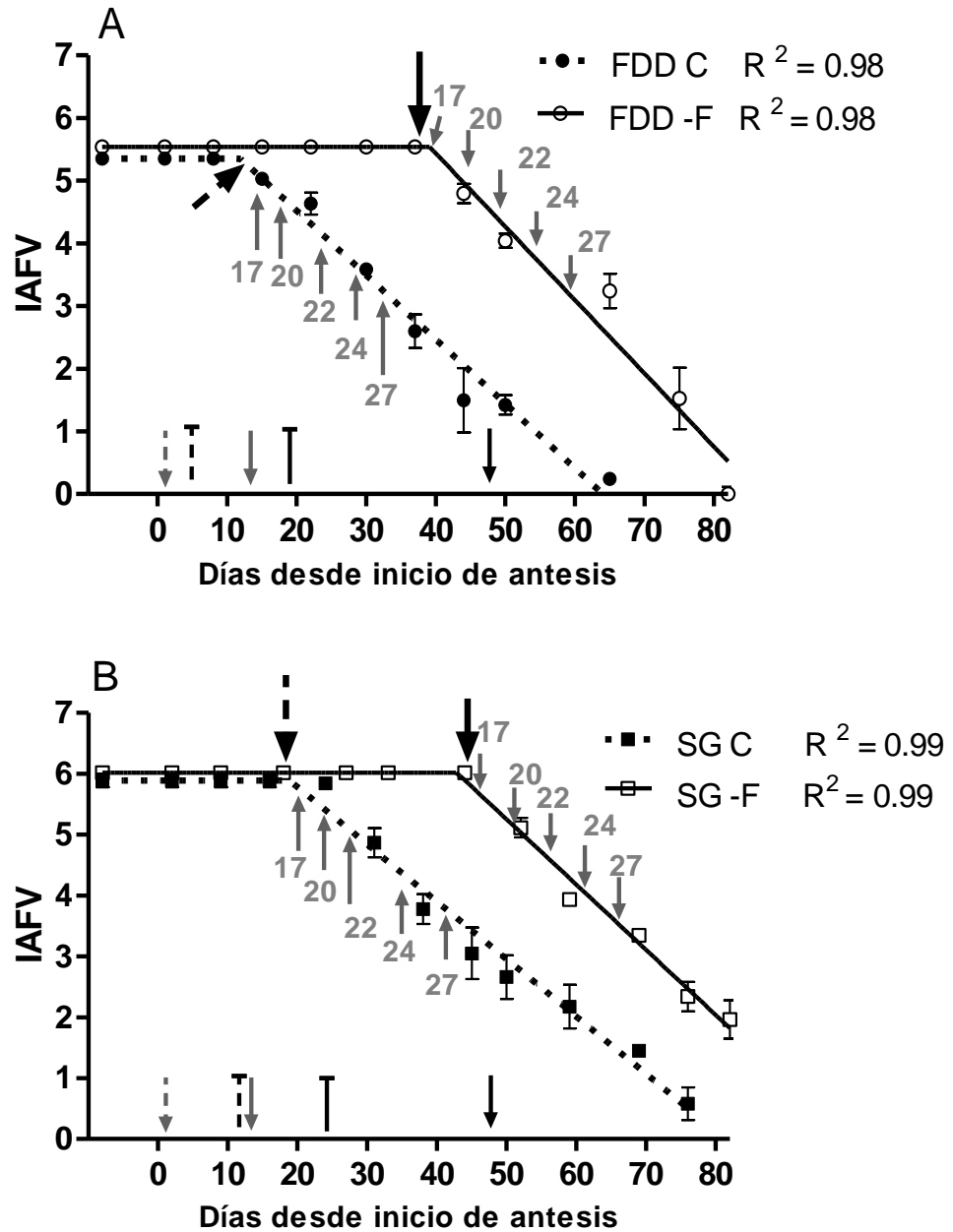
**B**

DDIA	Volumen recogido (ml)				Concentración de citocinina total (ng.ml <sup>-1</sup> )			
	SG C		SG -F		SG C		SG -F	
-8	48,3	a	51,0	a	10,1	j	10,1	j
-4	42,0	b	51,3	a	27,2	i	29,9	h
0	41,0	b	49,0	a	45,8	f	57,8	e
5	41,0	b	50,9	a	72,8	d	86,6	c
12	32,0	c	47,1	a	73,7	d	106,2	b
16	32,3	c	37,5	b	27,9	hi	119,4	a
29	12,3	f	25,5	d	27,4	hi	123,7	a
38	8,6	g	19,3	e	11,1	j	33,5	g

#### 4.3.4 Índice de área foliar verde (IAFV)

El momento de cambio de tasa de IAFV fue significativamente ( $p < 0.05$ ) posterior en los tratamientos desgranados en ambos híbridos (SG control [18 DDIA] respecto del desgranado [44 DDIA], y FDD control [12 DDIA] respecto del desgranado [44 DDIA] (Fig. 4.7). No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los valores máximos, entre los controles y los desgranados en ambos híbridos y años (Cuadro A3.4, Apéndice III), siendo el valor de esta variable, en promedio para el Año 1, de 5.35 y de 5.54, en el híbrido FDD control y desgranado respectivamente; y de 5.89 y 6.02, en el híbrido SG control y desgranado respectivamente. Desde el momento de inicio de senescencia (cambio en la tasa de los valores de IAFV), las tasas de isminución de IAFV no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ )





**Fig. 4.7.** Dinámica del índice de área foliar verde (IAFV), para los híbridos FDD (A) y SG (B) para los tratamientos de control (C) y desgranado (-F), durante el llenado de frutos. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el tiempo de inicio de la caída de IAFV en -F y C, respectivamente. Las flechas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 (gris discontinua), R6 (gris continua), y R9 (negra continua). Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cercanas al eje "x" indican el comienzo de la caída en la DLRV en -F y C, respectivamente. Las flechas grises continuas de trazo estrecho, cercanas a las funciones ajustadas para cada híbrido, indican el inicio de la senescencia de la hoja cuya posición se indica. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III. Datos correspondientes al Año 1.

entre tratamientos en ambos híbridos y años (Cuadro A3.4, Apéndice III). Es importante destacar que en ambos híbridos, debido a que los tratamientos desgranados mantuvieron los valores máximos de IAFV durante varios días después de que esta variable empezó a disminuir en los tratamientos control, los primeros exhibieron valores de IAFV mayores durante toda la fase de post-antesis, y esta diferencia se hizo proporcionalmente mayor a medida que avanzó la fase de llenado de frutos (Fig. 4.7). Por lo tanto, los valores a 50 DDIA (unos días después de R9 en ambos híbridos) para IAFV fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores (184% en el Año 1, 181% en el Año 2 en el híbrido SG; y 92% en el Año 1, 87% en el Año 2 en el híbrido FDD) en los tratamientos desgranados respecto de los controles en ambos años. Al igual que en los controles, el inicio de la senescencia de las cinco posiciones estudiadas en los tratamientos desgranados fue significativamente posterior en el híbrido SG en relación al FDD (Fig. 4.7, flechas grises).

### 4.3.5 Dinámica de la concentración de clorofila total en hojas

La dinámica de la concentración de clorofila total en las hojas de las cinco posiciones estudiadas y las diferencias en esta dinámica entre los tratamientos y las posiciones de las hojas dentro de cada híbrido, se ejemplifica para el Año 1 en los paneles C [FDD] y D [SG] de las Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, y 4.12. La dinámica de esta variable consistió en un valor *plateau* que persistió en el tiempo hasta un punto de quiebre, después del cual la concentración de clorofila total disminuyó en forma lineal. En la relación de esta variable con el tiempo térmico desde máxima expansión de la hojas, las interacciones entre los híbridos, los tratamientos y las posiciones de las hojas fueron significativas ( $p < 0.05$ ) para el momento de cambio de tasa y para la tasa de caída (Cuadro A3.3, Apéndice III). Estas interacciones son atribuibles principalmente a diferencias entre híbridos en la tasa de caída de la concentración de clorofila total en las hojas 17, 20 y 22. Las mismas fueron pequeñas en el tratamiento control de la posición 17 y mayores en los tratamientos desgranados de las posiciones 20 y 22. Esto da como resultado valores de clorofila similares en ambos híbridos a partir de 600 °Cdía en la hoja 17 (control), 1200 °Cdía en la hoja 20 (desgranado) y 1100 °Cdía en la hoja 22 (desgranado) desde la máxima expansión de las hojas. Los valores máximos de clorofila total no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos y las posiciones de las hojas dentro de cada híbrido, siendo el valor en promedio para ambos híbridos, tratamientos y todas las posiciones de hoja de 2.69 mg.g<sup>-1</sup>pesofresco. Las principales características que surgen de los datos de los paneles C [FDD] y D [SG] de las Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, y 4.12 es que en ambos híbridos el inicio de la fase de caída fue significativamente ( $p < 0.05$ ) posterior en las cinco posiciones de hoja en el tratamiento desgranado. Este retraso en favor del tratamiento desgranado fue de 567°Cdía y de 483°Cdía, para los híbridos FDD y SG respectivamente; y resultó en que las hojas de todas las posiciones de los tratamientos desgranados presentaran valores más altos de clorofila total a lo largo de la duración de la fase de caída, siendo (en promedio de todas las posiciones) dichas diferencias en el FDD del 7% y del 45%, y en el SG del 6% y del 39%, al inicio y al final respectivamente de la fase de caída de las hojas del tratamiento control de cada híbrido. Con respecto a las posiciones de las hojas, dentro de cada híbrido y tratamiento, prácticamente no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para el comienzo de la fase de caída; y se encontraron algunas diferencias que fueron pequeñas (aunque a veces significativas) en la pendiente de la fase de caída. En tanto en lo que se refiere a

las diferencias en la pendiente de la fase de caída en cada posición de hoja entre los tratamientos dentro de cada híbrido fueron pequeñas, aunque para algunas combinaciones híbrido por posición (FDD hoja 22 y 24; SG hoja 20 y 22) fueron significativas ( $p < 0.05$ ) (Cuadros A3.3 y A3.4, Apéndice III; y los paneles C [FDD] y D [SG] de las Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, y 4.12). Esto no alteró las principales características descriptas sobre la dinámica de esta variable. Las diferencias entre los tratamientos, dentro de cada híbrido, en el inicio de la senescencia (punto de quiebre de la concentración de clorofila total) en cada posición de hoja (ver flechas de color gris, Fig. 4.7) fueron consistentes con la observada para IAFV: la senescencia comenzó posteriormente, en todas las posiciones de hoja, en el tratamiento desgranado.

#### 4.3.6 Fotosíntesis Neta

La dinámica de la fotosíntesis neta en las cinco posiciones de hojas, y las diferencias en esta dinámica entre los tratamientos y las posiciones de las hojas dentro de cada híbrido, se ejemplifica para el Año 1 en los paneles E [FDD] y F [SG] de las Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, y 4.12. Las principales características de la respuesta de  $P_n$  a híbridos, tratamientos, posiciones de hojas, y tiempo térmico desde máxima expansión de la hoja fueron similares a las exhibidas por la concentración de clorofila total en hojas. Los valores máximos (*plateau*) de  $P_n$  no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos y las posiciones de las hojas dentro de cada híbrido, siendo en promedio para ambos híbridos, tratamientos y todas las posiciones de  $37 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . En ambos híbridos y en las cinco posiciones de hoja, la fase de caída comenzó significativamente ( $p < 0.05$ ) más tarde en los tratamientos desgranados. Este retraso en favor del tratamiento desgranado fue de  $561^\circ\text{Cdía}$  y de  $488^\circ\text{Cdía}$ , para los híbridos FDD y SG respectivamente; y resultó en que las hojas de todas las posiciones de los tratamientos desgranados presentaran valores más altos de fotosíntesis neta a lo largo de la duración de la fase de caída, siendo (en promedio de todas las posiciones) dichas diferencias en el FDD del 9% y del 1134%, y en el SG del 1% y del 892%, al inicio y al final respectivamente de la fase de caída de las hojas del tratamiento control de cada híbrido. Las diferencias en la pendiente de la fase de caída en cada posición de hoja, entre tratamientos dentro de cada híbrido fueron pequeñas, aunque para algunas combinaciones híbrido por posición (FDD hoja 24 y 27; SG hoja 17, 20, 22 y 24) fueron significativas ( $p < 0.05$ ) (Cuadro A3.4, Apéndice III; y paneles E [FDD] y F [SG] de las Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12). A pesar de que las diferencias en el momento de inicio de la fase de caída o en la pendiente de la fase de caída entre las posiciones de las hojas dentro de cada tratamiento e híbrido fueron significativas, no alteraron las principales características descriptas sobre la dinámica de esta variable. Gran parte de la interacción entre las posiciones de las hojas, híbridos y tratamientos (Cuadros A3.3 y A3.4, Apéndice III) para  $P_n$  fueron debido a las diferencias en el patrón temporal entre la hoja 17 y los tratamientos desgranados de las posiciones 20 y 22, con el resto. Es importante destacar que, el inicio de la fase de caída de  $P_n$  fue claramente asociada con el tiempo de la caída de la concentración de clorofila total (ver las flechas cerca de las funciones ajustadas en los paneles E [FDD] y F [SG] de las Figs. 4.8 [posición 17]; 4.9 [posición 20]; 4.10 [posición 22]; 4.11 [posición 24]; 4.12 [posición 27]).

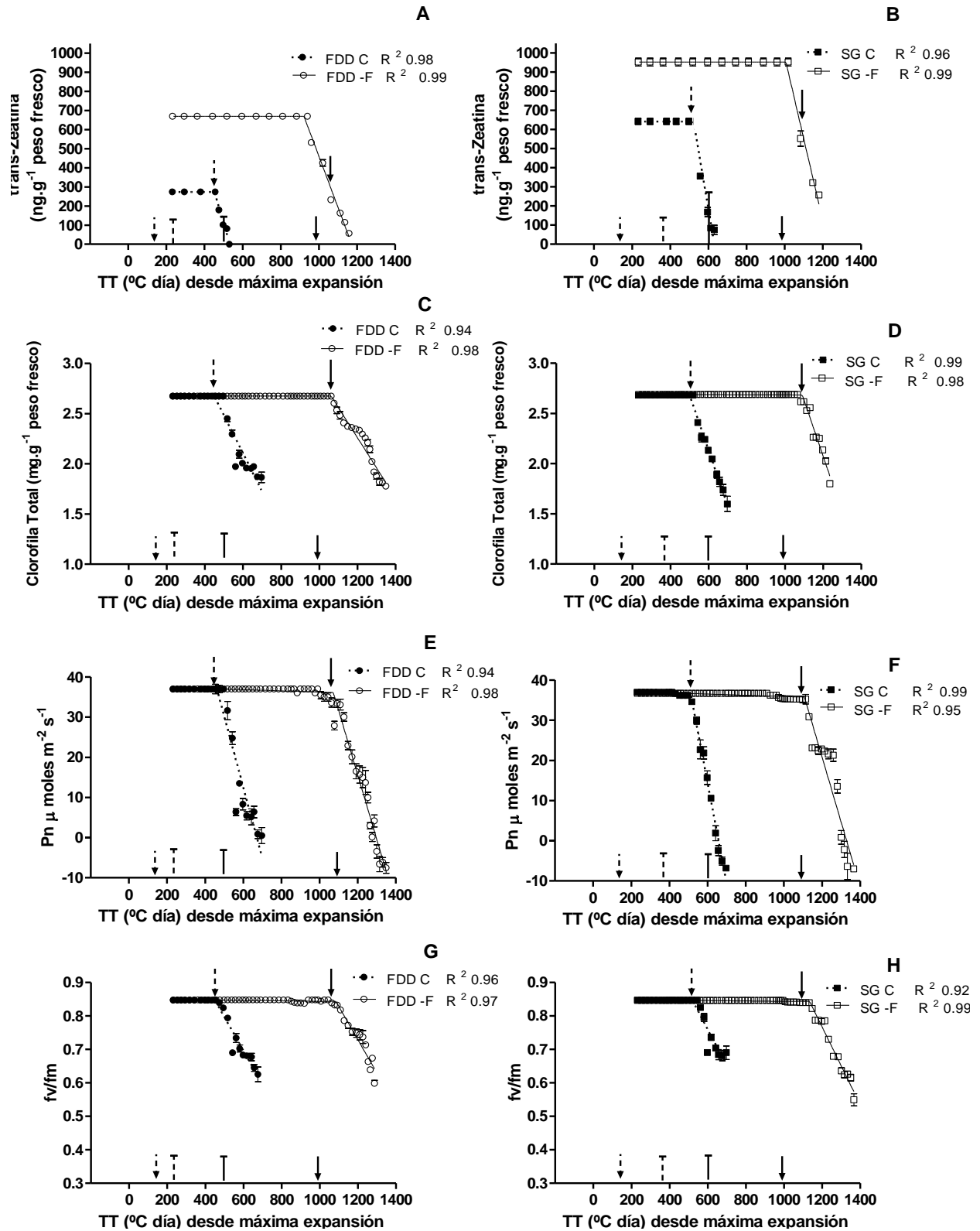
#### 4.3.7 Rendimiento cuántico del PSII

La dinámica de  $F_v/F_m$  en las cinco posiciones de hojas, y las diferencias en esta dinámica entre los tratamientos y las posiciones de las hojas dentro de cada híbrido, se ejemplifica para el Año 1 en los paneles G [FDD] y H [SG] de las Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, y 4.12. Al igual que con la clorofila total y  $P_n$ , se observa la falta de diferencias entre los tratamientos y las posiciones de las hojas dentro de cada híbrido para los valores máximos (*plateau*) de  $F_v/F_m$  (0.85 en promedio para ambos híbridos, tratamientos y todas las posiciones de hoja), un retraso en el momento del inicio de la fase de la caída de los tratamientos desgranados (562 °Cdía y de 490 °Cdía, para los híbridos FDD y SG respectivamente), en general, combinado con pequeñas diferencias en la pendiente de la fase descendente, que condujo a mayores valores de  $F_v/F_m$  en las hojas de los tratamientos desgranados en las cinco posiciones de hoja. Estas diferencias en los valores de  $F_v/F_m$ , a favor de los tratamientos desgranados y en promedio de todas las posiciones, fueron en el FDD del 2% y del 31% y en el SG del 0.5% y del 29%, al inicio y al final respectivamente de la fase de caída de las hojas del tratamiento control de cada híbrido. A pesar de que las diferencias en el momento de inicio de la fase de caída o en la pendiente de la fase de caída entre las posiciones de las hojas dentro de cada híbrido y tratamiento fueron significativas ( $p < 0.05$ ), no alteraron las principales características descriptas sobre la dinámica de esta variable (Cuadros A3.3 y A3.4 Apéndice III). Al igual que con  $P_n$ , el momento del inicio de la fase de caída en los valores de  $F_v/F_m$  a través de las posiciones y tratamientos dentro de cada híbrido estuvo estrechamente asociado con el comienzo de la caída de los valores de clorofila total de la hoja (ver las flechas cerca de las funciones ajustadas en los paneles G [FDD] y H [SG] de las Figs. 4.8 [posición 17]; 4.9 [posición 20]; 4.10 [posición 22]; 4.11 [posición 24]; 4.12 [posición 27]).

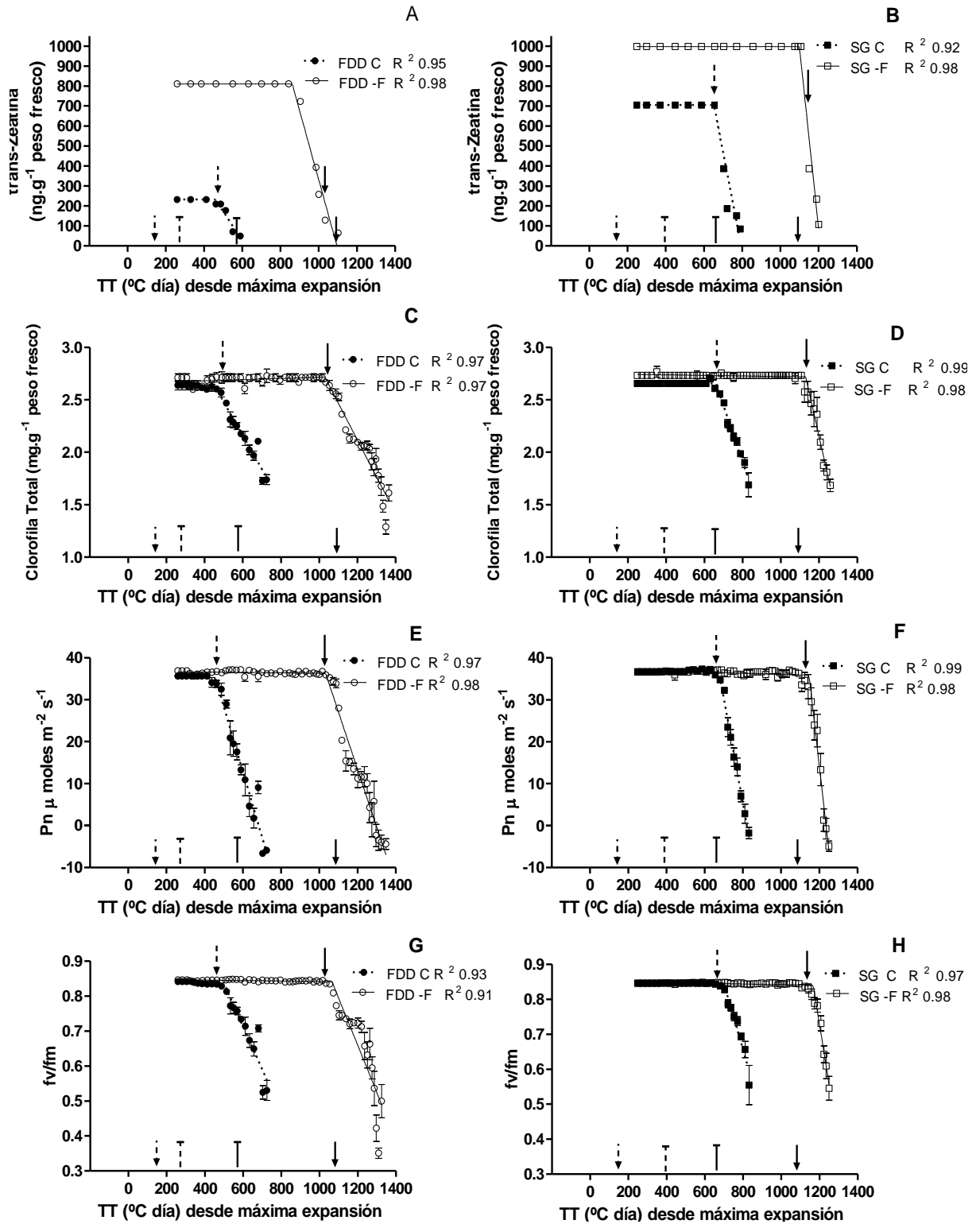
#### 4.3.8 Dinámica de la concentración de trans-Zeatina en hojas

La dinámica de la concentración de trans-Zeatina en las cinco posiciones de hojas y las diferencias en esta dinámica entre los tratamientos y las posiciones de las hojas dentro de cada híbrido, se ejemplifica para el Año 1 en los paneles A [FDD] y B [SG] de las Figs. 4.8 (posición 17), 4.9 (posición 20), 4.10 (posición 22), 4.11 (posición 24), 4.12 (posición 27). Dentro de las características sobresalientes de la dinámica de la concentración de trans-Zeatina, se destaca en primer lugar la muy amplia y significativa ( $p < 0.05$ ) diferencia en las concentraciones iniciales (*plateau*) en favor de los tratamientos desgranados dentro de cada híbrido. Estas diferencias fueron mayores entre tratamientos en el FDD (144%, 249%, 365%, 822% y 878% en el FDD; 48%, 42%, 22%, 28% y 8% en el SG; para las posiciones 17, 20, 22, 24 y 27 respectivamente). A pesar de ello, las concentraciones de trans-Zeatina por debajo de las cuales se desencadena el inicio de la senescencia foliar (momento de caída de la concentración de clorofila total, fotosíntesis neta y  $F_v/F_m$ ) no difirieron significativamente ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos dentro de cada híbrido y posición de hoja. Esto refuerza fuertemente la idea de que este proceso se desencadena por debajo de un valor umbral de trans-Zeatina, ya que independientemente de las concentraciones iniciales el proceso se desencadena a una misma concentración de trans-Zeatina en cada combinación híbrido x posición. Además es importante señalar que las diferencias en las concentraciones iniciales de

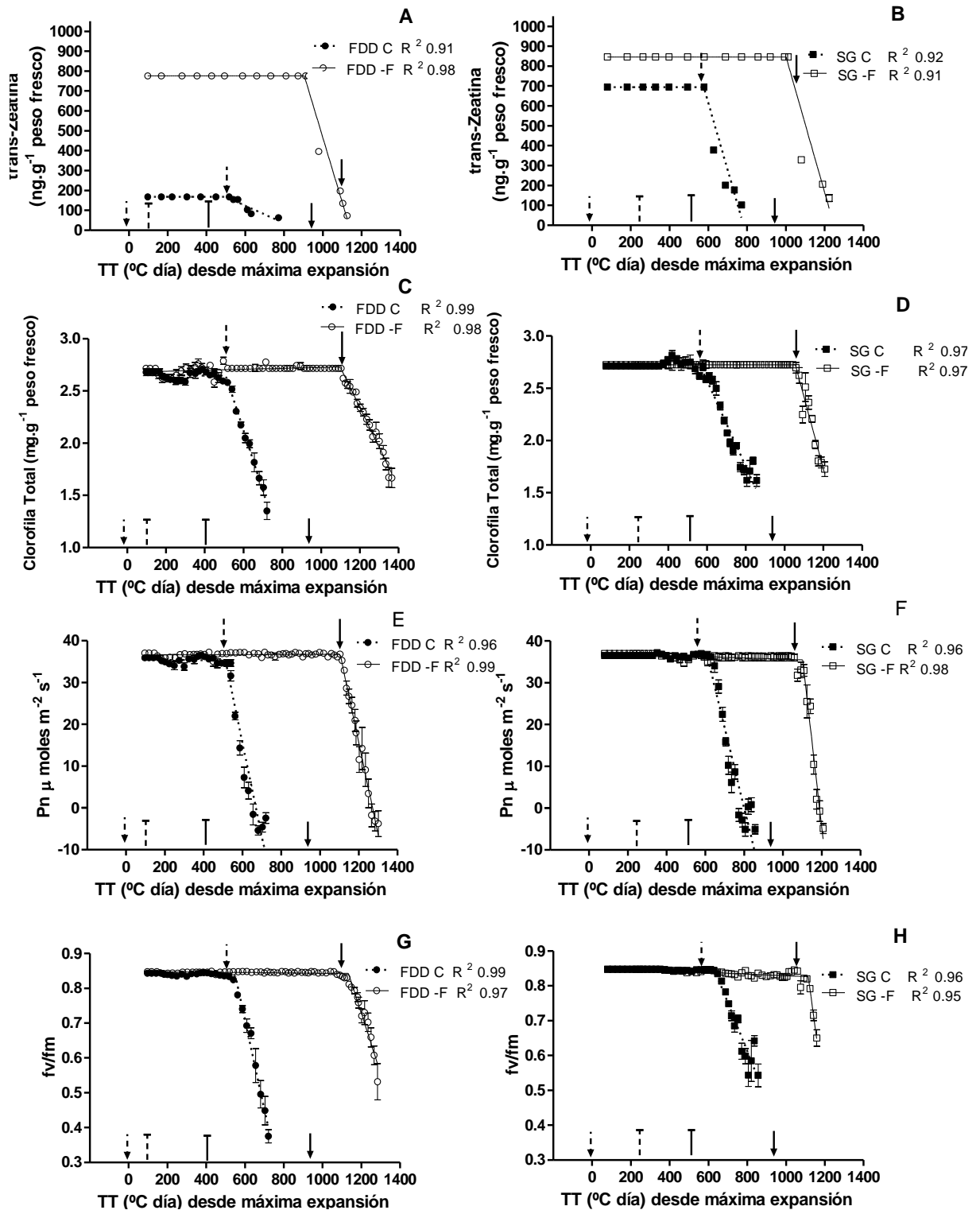
trans-Zeatina, en favor del híbrido SG, en los tratamientos control fueron de 134%, 204%, 316%, 698% y 834%; y en los tratamientos desgranados fueron de 42%, 23%, 9%, 10% y 3% para las posiciones 17, 20, 22, 24 y 27 respectivamente. Esto marca que ante la situación de desgrane las diferencias en las concentraciones iniciales de trans-Zeatina entre ambos híbridos disminuyen. En segundo lugar, se observa un retraso significativo ( $p < 0.05$ ) en el momento de inicio de la fase de caída en los tratamientos desgranados en ambos híbridos (415 °Cdía en FDD y 437 °Cdía en SG en promedio para todas las posiciones). Por último, se encontraron diferencias en la pendiente de la fase de caída entre tratamientos dentro de cada híbrido que (aunque a veces fueron significativas) no tuvieron un impacto importante sobre la dinámica de esta variable (Cuadros A3.3 y A3.4, Apéndice III). La diferencia en los valores iniciales de trans-Zeatina entre los tratamientos control y desgranado en ambos híbridos fue tan grande que las hojas del tratamiento desgranado mantuvieron mayores valores de trans-Zeatina durante todo el período de medición. En promedio de todas las posiciones de hoja, las diferencias en favor del tratamiento desgranado fueron en el FDD del 492% y del 1744%, y en el SG del 29% y del 1092% al inicio y al final respectivamente del período de medición de las hojas del tratamiento control de cada híbrido. Hubo algunas interacciones significativas entre tratamientos, posición de hoja e híbridos para los valores iniciales (*plateau*) de trans-Zeatina; momento de inicio de la fase de caída y en la pendiente de la fase de caída; pero estas interacciones no alteraron las principales características de la dinámica de esta variable (paneles A y B Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12). A diferencia de los controles, en los tratamientos desgranados los momentos de inicio de la caída de los valores de trans-Zeatina fueron anteriores ( $p < 0.05$ ) que los de clorofila total, a excepción de las posiciones 20 y 27 del SG en las cuales si bien los valores de trans-Zeatina caen antes que los de clorofila total, dichas diferencias no fueron significativas (ver Cuadro 4.2 y las flechas cerca de las funciones ajustadas en los paneles A [FDD] y B [SG] de las Figs. 4.8 [posición 17], 4.9 [posición 20], 4.10 [posición 22], 4.11 [posición 24], 4.12 [posición 27]). Claramente esto se debe a que las caídas en las variables clorofila total, fotosíntesis neta y en  $F_v/F_m$  (inicio de senescencia foliar) ocurrieron después de que los valores de trans-Zeatina llegaran a los valores umbrales de trans-Zeatina estimados en el Capítulo III.



**Fig. 4.8.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D), en función del tiempo térmico (Tb  $4^{\circ}\text{C}$ ) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 17, en los híbridos fast dry down (FDD, A, C, E, G) y stay green (SG, B, D, F, H) para los tratamientos control (C) y desgranado (-F). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en -F y C, respectivamente. Las flechas discontinuas y continuas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 y R9, respectivamente. Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cerca del eje "x" indican el comienzo de la caída de la DLRV en -F y C, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III. Datos correspondientes al año 1.

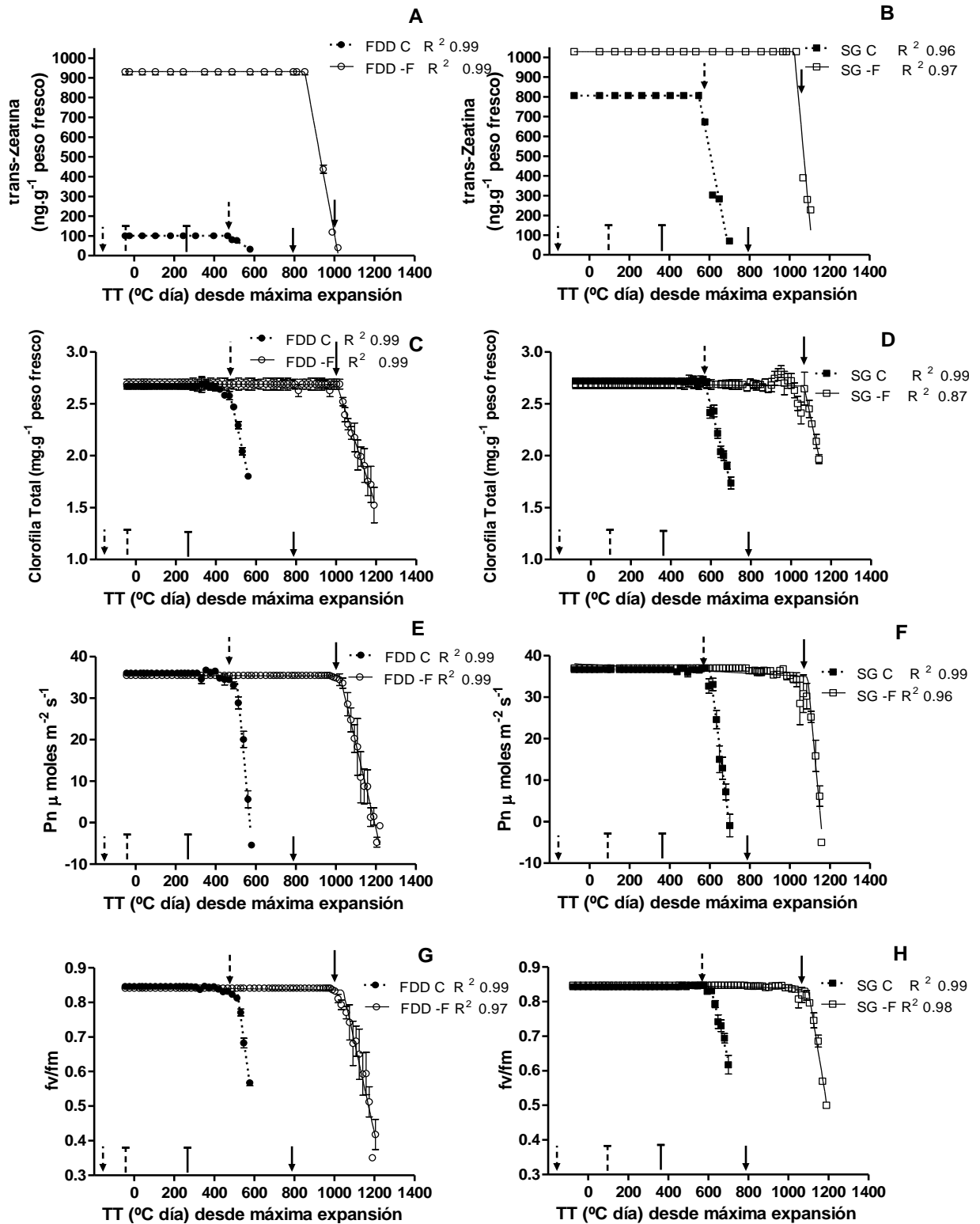


**Fig. 4.9.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D), en función del tiempo térmico (Tb 4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 20, en los híbridos fast dry down (FDD, A, C, E, G) y stay green (SG, B, D, F, H) para los tratamientos control (C) y desgranado (-F). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en -F y C, respectivamente. Las flechas discontinuas y continuas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 y R9, respectivamente. Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cerca del eje "x" indican el comienzo de la caída de la DLRV en -F y C, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. (n = 5). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III. Datos correspondientes al año 1.

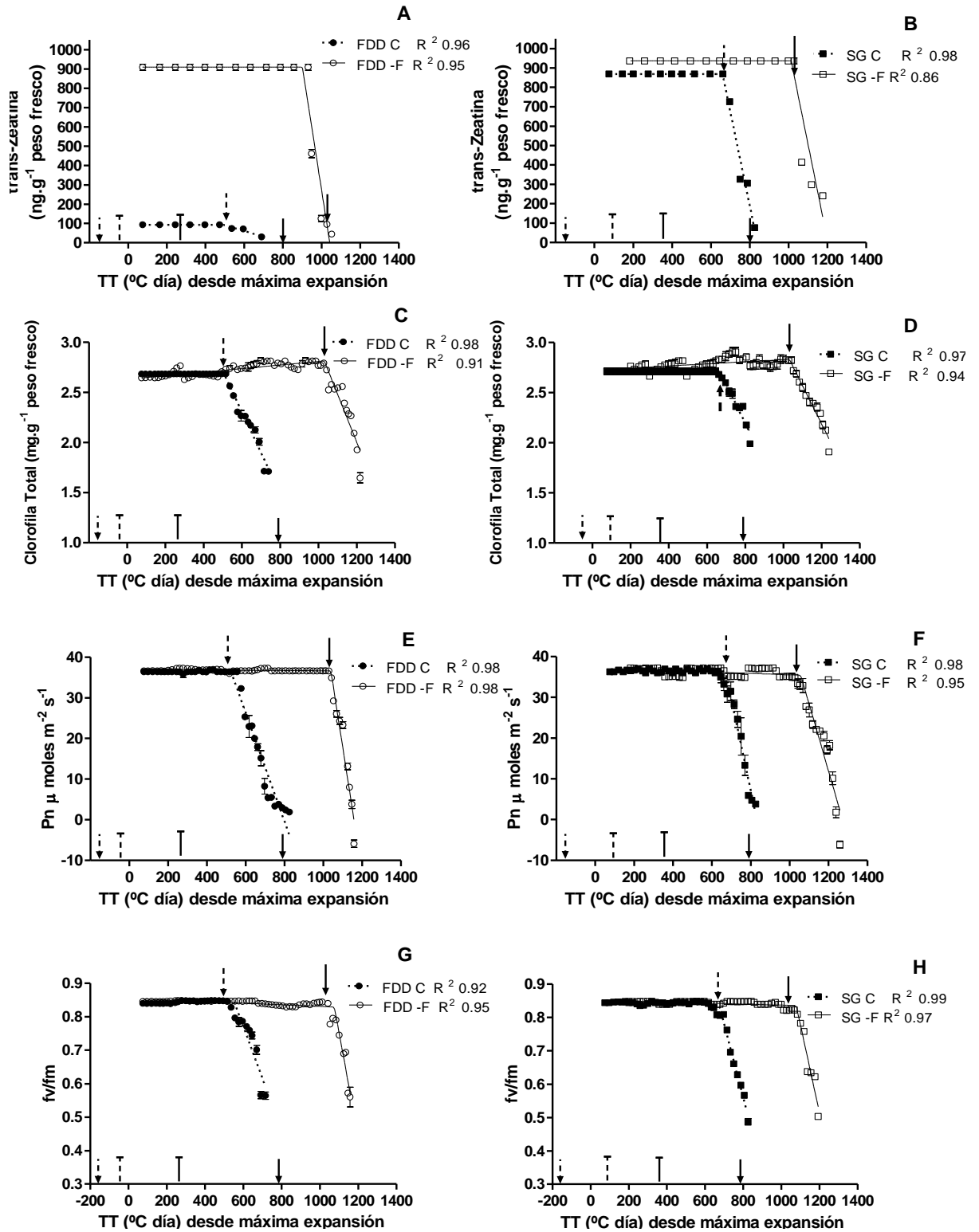


**Fig. 4.10.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D), en función del tiempo térmico (Tb  $4^{\circ}\text{C}$ ) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 22, en los híbridos fast dry down (FDD, A, C, E, G) y stay green (SG, B, D, F, H) para los tratamientos control (C) y desgranado (-F). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en -F y C, respectivamente. Las flechas discontinuas y continuas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 y R9, respectivamente. Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cerca del eje "x" indican el comienzo de la caída de la DLRV en -F y C, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. (n = 5). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III. Datos correspondientes al año 1.





**Fig. 4.11.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D), en función del tiempo térmico (Tb 4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 24, en los híbridos fast dry down (FDD, A, C, E, G) y stay green (SG, B, D, F, H) para los tratamientos control (C) y desgranado (-F). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en -F y C, respectivamente. Las flechas discontinuas y continuas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 y R9, respectivamente. Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cerca del eje "x" indican el comienzo de la caída de la DLRV en -F y C, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. (n = 5). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III. Datos correspondientes al año 1.



**Fig. 4.12.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina (A) y de clorofila total (B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C) y del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ , D), en función del tiempo térmico (Tb 4°C) desde la máxima expansión de la hoja de la posición 27, en los híbridos fast dry down (FDD, A, C, E, G) y stay green (SG, B, D, F, H) para los tratamientos control (C) y desgranado (-F). La dinámica de C es la que se presentó en el Capítulo II. Las flechas negras de trazo amplio, continuas y discontinuas, cercanas a las funciones ajustadas, indican el momento en el que comienza la caída de la concentración de clorofila total en -F y C, respectivamente. Las flechas discontinuas y continuas de trazo estrecho cercanas al eje "x" indican los momentos de R5.1 y R9, respectivamente. Las líneas verticales continuas y discontinuas coronadas cerca del eje "x" indican el comienzo de la caída de la DLRV en -F y C, respectivamente. Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. (n = 5). Los valores de  $R^2$  de las funciones ajustadas se muestran junto a los códigos de los tratamientos. Los valores de los parámetros de las funciones ajustadas se presentan en el Cuadro A3.4, Apéndice III. Datos correspondientes al año 1.

**Cuadro 4.2.** Momento en el cual ocurre el cambio de fase (*plateau* previo a la caída > fase de caída) en la evolución de la clorofila total, de la fotosíntesis neta, del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) y de la concentración de trans-zeatina en las distintas posiciones de hoja en un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG) en el tratamiento desgranado (-F). Cada valor corresponde al tiempo térmico (TT) [ $T_b=4^\circ\text{C}$ , Villalobos y Ritchie (1992)] acumulado desde la finalización de la expansión de la hoja, y es promedio de cinco observaciones ( $n = 5$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) dentro de cada combinación híbrido x posición de hoja (filas del cuadro). Datos correspondientes al Año 1.

<i>Híbrido</i>	<i>Posición de Hoja</i>	<i>Clorofila Total</i> TT ( $^\circ\text{Cdía}$ )		<i>Fotosíntesis Neta</i> TT ( $^\circ\text{Cdía}$ )		<i>Fv/Fm</i> TT ( $^\circ\text{Cdía}$ )		<i>trans-Zeatina</i> TT ( $^\circ\text{Cdía}$ )	
<b>FDD -F</b>	<b>17</b>	1062	a	1072	a	1086	a	922	b
<b>SG -F</b>	<b>17</b>	1091	b	1108	ab	1134	a	1007	c
<b>FDD -F</b>	<b>20</b>	1029	a	1033	a	1066	a	862	b
<b>SG -F</b>	<b>20</b>	1131	ab	1147	a	1167	a	1100	b
<b>FDD -F</b>	<b>22</b>	1099	a	1104	a	1134	a	905	b
<b>SG -F</b>	<b>22</b>	1056	b	1102	a	1115	a	1001	c
<b>FDD -F</b>	<b>24</b>	1005	a	1021	a	1044	a	852	b
<b>SG -F</b>	<b>24</b>	1065	a	1089	a	1098	a	1024	b
<b>FDD -F</b>	<b>27</b>	1030	b	1039	ab	1076	a	901	c
<b>SG -F</b>	<b>27</b>	1032	bc	1058	ab	1078	a	1014	c

#### 4.4 Discusión

Las diferencias en la senescencia foliar entre los tratamientos control y desgranado en cada híbrido no pueden ser atribuidas a variaciones en el desarrollo del cultivo o a las condiciones ambientales a las que estaban expuestos los híbridos (ver Sección 4.3.1.). En ambos materiales, todas las variables medidas disminuyeron antes en el tratamiento control en relación al tratamiento desgranado (Figs. 4.1 A y B, 4.6 A y B, 4.7 A y B [flechas grises numeradas] 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12).

Nuestra hipótesis inicial de que alteraciones en el coeficiente de partición de hidratos de carbono a favor del sistema radical, provocaría un incremento en la cantidad de citocininas en el fluido xilemático y en la concentración a nivel de hoja, ha demostrado ser correcta para ambos híbridos. Los cambios impuestos en la partición de los hidratos de carbono, mostraron respuestas semejantes en ambos híbridos, determinando un aumento en los niveles de DLRV (Fig. 4.1 A y B, Fig. 4.4, Fig. 4.5), repercutiendo en un incremento en las cantidades de citocininas que se transportaban hacia las hojas a través del fluido xilemático (Fig. 4.6 A y B). Estas mayores cantidades de citocininas transportadas hacia la parte aérea, determinaron aumentos en las concentraciones iniciales de trans-Zeatina a nivel de hoja en todas las posiciones (Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, paneles A y B). En los tratamientos desgranados el híbrido SG también presentó mayores concentraciones iniciales de trans-Zeatina a nivel de hoja que el híbrido FDD, pero en menor porcentaje respecto a esta diferencia en los tratamientos control (ver sección 4.3.8). Esto se debe a que ante la alteración de la partición de los

hidratos de carbono, en favor de las raíces, el híbrido FDD presentó una mayor respuesta en el incremento en la DLRV que el híbrido SG. Las mayores concentraciones de citocininas en hojas, determinaron un retraso en el inicio de la senescencia foliar a nivel de canopeo (Fig. 4.7 A y B) y a nivel de hoja en todas las posiciones (Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12, paneles C, D, E, F, G y H). No obstante es importante remarcar que el retraso de la caída del IAFV es mayor que el retraso de la disminución del flujo de citocininas. Esto puede sugerir que los frutos estén ejerciendo un efecto adicional como promotores de la senescencia, tal como un retrocontrol en la biosíntesis de citocininas a nivel radical y que ante el desgrane, el mismo se distorsione o se pierda. Tampoco se puede descartar que bajo la situación de desgrane la tasa de degradación o el número de receptores de citocininas varíe. Estos planteos podrían explicar el “delay” entre la caída de la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático y la caída del IAFV. Si bien las concentraciones de trans-Zeatina iban disminuyendo junto con la DLRV, y con las cantidades de citocininas transportadas a través del fluido xilemático; para ambos híbridos y para todas las posiciones estudiadas hasta que no se alcanzaron valores menores a los umbrales estimados en el Capítulo III no se inició el proceso de senescencia foliar (Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12 y para apreciar las diferencias en los momentos de caída, entre las variables, ver Cuadro 4.2). Esto es extremadamente importante y no deja dudas acerca de que el inicio de este proceso se encuentra relacionado con un umbral mínimo de trans-Zeatina. Esto no está documentado en la bibliografía, y es de una gran relevancia. Los resultados de este capítulo sobre el efecto de la eliminación del capítulo coinciden con los reportados en trigo por Srivalli et al. (2009), respecto a que la eliminación del destino promovió el crecimiento radical (Fig. 4.1, Imágenes 4.3 y 4.4); coinciden en parte con lo reportado por Henzell y Gillieron (1973) respecto al efecto sobre la senescencia foliar, ya que encontraron disminuciones en la tasa de senescencia foliar al eliminar la panoja en sorgo, y nuestros resultados arrojaron diferencias en el momento de inicio de la senescencia foliar y no en la tasa del proceso (Fig. 4.7 y Cuadro A3.4, Apéndice III); y coinciden con lo reportado por Noodén et al. (1990) que documentaron incrementos en las concentraciones de citocininas en el fluido xilemático en soja al remover los frutos, lo cual es semejante al incremento en las cantidades de citocininas totales hallados en el fluido xilemático al remover los frutos (Fig. 4.6). A diferencia de todos estos trabajos, en ninguno se estudió en su conjunto todas las variables evaluadas durante el período de llenado de frutos, bajo condiciones de alteraciones en la relación fuente/destino que modifiquen el coeficiente de partición de hidratos de carbono hacia las raíces, en el contexto de dos híbridos de senescencia foliar contrastantes tal como se describe en el presente capítulo.

Los resultados de este capítulo coinciden con el modelo de respuesta de la participación de las citocininas en la senescencia foliar para el período de post-antesis. Los mismos son consistentes con que la disminución de la DLRV, provoca una disminución en la cantidad de citocininas en el fluido xilemático, y como consecuencia de ello disminuye la concentración de citocininas a nivel foliar por debajo del umbral crítico de cada posición dando inicio al proceso de senescencia foliar, presentando el híbrido SG mayores concentraciones de citocininas que retrasan el inicio de la senescencia foliar consecuencia de una mayor DLRV. Las variaciones en la relación fuente destino que modifiquen el coeficiente de partición de hidratos de carbono hacia las raíces afectando la DLRV, repercutirá tanto en las cantidades de citocininas transportadas a la parte aérea por el fluido xilemático, como en las concentraciones de citocininas en hojas y en el inicio de la senescencia foliar.

Hasta aquí, se han informado los resultados de los experimentos realizados en los tres capítulos de resultados de esta tesis. En el siguiente capítulo de discusión

general se plantearán y discutirán los mensajes más relevantes de la investigación en su conjunto, en el marco de los objetivos inicialmente planteados y se expondrán los nuevos interrogantes que emergieron a partir de los resultados.

## **Capítulo V**

### **Discusión general y conclusiones**

## Capítulo V

### Discusión general y conclusiones

#### 5.1 Introducción

El proceso de senescencia foliar durante la etapa de llenado de granos reduce significativamente el rendimiento de los cultivos debido a la disminución de la asimilación del carbono y, como consecuencia de ello, disminuye la producción de biomasa durante esa etapa (cebada y trigo [Gregersen et al., 2008], maíz [Rajcan et al., 1999; Rajcan y Tollenaar, 1999a]). Las citocininas, sintetizadas principalmente a nivel de los ápices radicales (Akiyoshi et al., 1983; Akiyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984; Beveridge et al., 1997; Samuelson et al., 1992; Takei et al., 2001; White et al., 1934) y transportadas a la parte aérea a través del xilema (Noodén et al. 1990, Takei et al., 2001), desempeñan funciones importantes en la senescencia como señal endógena (Richmond y Lang, 1957; Noodén et al., 1979 y 1997; Singh et al., 1992; Gan y Amasino, 1995; Ori et al., 1999; McCabe et al., 2001; Masferrer et al., 2002; Lim et al., 2007; Conrad et al., 2015; Liu et al., 2016; Ren et al., 2016).

En la bibliografía no existen trabajos que hayan documentado el proceso de senescencia foliar durante el llenado de los frutos enfocándose en el papel de las citocininas en ese proceso usando como modelo experimental híbridos con patrones de senescencia foliar contrastante, y considerando el proceso a nivel de planta entera (incluyendo las raíces) en cultivos conducidos a campo. Tampoco existen precedentes en girasol, ni en ninguna otra especie cultivada, en los que se hayan realizado intentos por determinar el umbral de citocininas foliares por debajo del cual se desencadena el proceso de senescencia foliar; ni por evaluar como variaciones en la actividad radical, en respuesta a la alteración en la partición de los hidratos de carbono hacia ese órgano, repercuten sobre dicho proceso. Por último, la bibliografía no incluye trabajos que hayan documentado, en forma detallada, la dinámica del proceso de senescencia a nivel de hoja durante el llenado de los frutos reflejada en los niveles foliares de trans-Zeatina y en los parámetros de funcionalidad foliar [clorofila total, fotosíntesis neta y  $F_v/F_m$ ]; ni sus relaciones con las concentraciones y las cantidades de citocininas totales recolectadas en el fluido xilemático.

En el contexto descripto arriba, los experimentos realizados para esta tesis exploraron el proceso de senescencia a nivel de planta entera en dos híbridos de girasol de senescencia foliar contrastante, estableciendo que la dinámica de la DLRV durante esa etapa resulta coincidente con las variaciones en las concentraciones de citocininas que se mueven hacia la parte aérea en el fluido xilemático, y que producen modificaciones en los niveles de citocininas en las hojas. Estos experimentos, además permitieron estimar un umbral crítico de citocininas, revelado por el uso de aplicaciones exógenas, que se asoció con el inicio del proceso de senescencia foliar. Por último, las respuestas a las alteraciones en las relaciones fuente-destino que modificaron el coeficiente de partición de hidratos de carbono hacia las raíces, mostraron que esas alteraciones afectaron positivamente a la DLRV. Esto provocó un incremento en las concentraciones de citocininas a nivel de fluido xilemático y de hoja, retrasando el inicio de la senescencia foliar, respuesta coherente con lo observado en plantas intactas.

## 5.2 Evaluación del logro de objetivos y de la validación de hipótesis propuestos para la tesis

El objetivo general y los objetivos específicos declarados en el Capítulo I, fueron logrados. Estos logros permitieron poner a prueba las hipótesis propuestas, tal como se detalla más abajo.

El inicio de la senescencia foliar (Capítulo II Figs. 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7) en ambos híbridos, demostró estar estrechamente relacionado a un umbral mínimo de trans-Zeatina a nivel de hoja, variable ligada a la concentración ( $\text{ng.ml}^{-1}$ recogido) (Capítulo III Cuadro 3.1) y a las cantidades de citocininas totales recogidas ( $\text{ng.minuto}^{-1}$ ) (Capítulo III Fig. 3.1) en el fluido xilemático y, a su vez, relacionado con la dinámica de la DLRV (Capítulo II Fig. 2.2). A partir del valor máximo de la DLRV (Capítulo II Fig. 2.2) se produjo una disminución de dicha variable que coincidió con la reducción de la concentración ( $\text{ng.ml}^{-1}$ recogido) (Capítulo III Cuadro 3.1) y de la cantidad ( $\text{ng.minuto}^{-1}$ ) (Capítulo III Fig. 3.1) de citocininas totales en el fluido xilemático, lo cual repercutió posteriormente en el inicio de la senescencia del canopeo (Capítulo II Fig. 2.2).

Es importante también señalar que la cantidad de citocininas totales recuperadas de la savia xilemática en el período de medición se incrementó abruptamente pos-antesis, patrón que no reflejó -en forma proporcional- un aumento de la DLRV en el mismo intervalo, pero sí con el incremento del índice que relacionó a la concentración de citocinina total ( $\text{ng.ml}^{-1}$  recogido en el período de observación) con la DLRV (Cuadro 3.2). El incremento en dicho índice podría ser explicado por la capacidad de síntesis de citocininas que tienen las raíces en respuesta a señales asociadas a la antesis, o a un incremento de raíces jóvenes en este período que tengan una elevada tasa de síntesis de citocininas. Este hallazgo requiere ser objeto de futuras investigaciones.

Las concentraciones iniciales de citocininas en hojas fueron significativamente mayores en el híbrido SG en relación al híbrido FDD. Esto se asoció a que el híbrido SG presentó valores significativamente mayores en la DLRV durante todo el período de medición y a que el híbrido SG presentó valores significativamente mayores en la concentración ( $\text{ng.ml}^{-1}$ recogido) (Capítulo III Cuadro 3.1.) y en las cantidades recogidas ( $\text{ng.minuto}^{-1}$ ) (Capítulo III Fig. 3.1) de citocininas totales en el fluido xilemático prácticamente en todos los estadios fenológicos estudiados. El híbrido SG mostró un retraso en el tiempo en el inicio de la caída de todas las variables medidas en comparación con el híbrido FDD (Capítulo II Figs. 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, Capítulo III Figs. 3.1 y 3.2). Es importante señalar que las diferencias entre híbridos, en la concentración y en las cantidades recogidas de citocininas totales en el fluido xilemático, no fueron proporcionales a las diferencias en la DLRV, y que esto podría estar relacionado con que el SG produzca más citocininas por unidad de DLRV (Capítulo III, Cuadro 3.2). Otro aspecto importante a considerar es que las diferencias en las citocininas foliares entre híbridos no son proporcionales a las diferencias en la concentración de citocininas totales en el fluido xilemático. Estas cuestiones indican la necesidad de realizar estudios con el fin de establecer diferencias en la sensibilidad a las citocininas, en el número de receptores de citocininas, en la tasa de degradación de las citocininas o en otros aspectos de la economía de citocininas foliares a fin de seguir develando las causas de las diferencias entre híbridos.

En su conjunto la información arriba señalada permite no rechazar la *Hipótesis 1.1* (Capítulo I) “La concentración de citocininas en el fluido xilemático y en las hojas, están asociadas con el nivel de funcionalidad del sistema radical durante el llenado de los frutos, exhibiendo el híbrido SG mayor funcionalidad radical y mayores



*concentraciones de citocininas en el fluido xilemático y en hojas que el híbrido FDD.*”. Estos resultados permiten aseverar que el inicio de la senescencia foliar es posterior al inicio de la senescencia radical, ya que la disminución de la concentración ( $\text{ng.ml}^{-1}$  recogido) y de las cantidades recogidas ( $\text{ng.minuto}^{-1}$ ) de citocininas totales en el fluido xilemático afecta la concentración de citocininas en hojas, resultando en que la misma descienda por debajo del umbral mínimo que desencadena el inicio del proceso de senescencia foliar. Haber demostrado esto amplía el conocimiento del proceso de senescencia foliar conocido hasta el momento, ya que si bien los resultados alcanzados por Lisanti et al. (2013) demostraron que el inicio de la senescencia radical antecede al inicio de la senescencia foliar, no establecieron relación alguna entre la senescencia radical y la foliar. En este trabajo, por primera vez, se logró ubicar a las citocininas como las responsables en establecer una comunicación clara y directa entre el inicio de la caída de la DLRV y el del IAFV. Asimismo los trabajos en los cuales se ha demostrado que las caídas en las concentraciones de citocininas foliares están asociadas al inicio de la senescencia foliar, en otras especies como tabaco (Singh et al., 1992; Gan y Amasino, 1995; Ori et al., 1999), lechuga (*Lactuca sativa* L.) (McCabe et al., 2001), *Phragmites australis* (Conrad et al., 2015), arroz (Liu et al., 2016), maíz (Ren et al., 2016), *Xanthium* (Richmond y Lang, 1957), soja (Noodén et al., 1979), *Arabidopsis thaliana* L. (Masferrer et al., 2002) y sorgo (Ambler et al., 1992); tampoco establecieron relaciones directas con la funcionalidad del sistema radical, algo que hubiese permitido una visión del proceso de senescencia a nivel de planta entera.

En relación con la *Hipótesis 1.2* (Capítulo I) “*El momento de inicio y la tasa de senescencia foliar se hallan fuertemente asociadas con la concentración de citocininas en el fluido xilemático y de un umbral mínimo a nivel de hoja. Ello explicaría las diferencias observadas en la dinámica de la senescencia foliar entre los materiales SG y FDD.*”, la misma resultó ser coherente con nuestras observaciones en lo relativo al inicio del proceso de senescencia foliar. No obstante, la tasa de senescencia foliar no explicó las diferencias entre materiales (Capítulo II Cuadro 2.3 y Figs. 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8), sugiriendo que la cuestión crucial era el gatillado del proceso dado por la disminución de las concentraciones de trans-Zeatina por debajo de un umbral mínimo. Además, nuestros datos sugieren la necesidad de plantear una hipótesis complementaria debido a que las diferencias entre SG y FDD en la dinámica de la senescencia foliar no se debió únicamente a una diferencia en el momento de inicio de la senescencia, sino que también estuvo asociada a una gran diferencia en los valores iniciales de trans-Zeatina en hojas (que no presentaron diferencias con los umbrales de cada posición) entre ambos híbridos (Capítulo II Panel A de las Figs. 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8), asociado a las mayores concentraciones ( $\text{ng.ml}^{-1}$  recogido) y cantidades recogidas ( $\text{ng.minuto}^{-1}$ ) de citocininas totales en el fluido xilemático desde inicio de anthesis (Capítulo III Fig. 3.1). Esto responde y se corresponde con las marcadas diferencias en la dinámica de la DLRV (Capítulo II Fig. 2.2). La hipótesis complementaria que requeriría ser puesta a prueba en el futuro sería: “*El inicio de la senescencia foliar de los dos híbridos se asoció a un valor umbral de trans-Zeatina muy diferente entre híbridos, umbral que una vez traspasado a la baja, marcó el inicio de la senescencia*”. (Capítulo II Panel A de las Figs. 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8).

Las aplicaciones exógenas mantuvieron las concentraciones de citocininas en las hojas por encima del umbral causando un retraso en la senescencia foliar, lo cual se reflejó en la reducción de la caída de clorofila total (Capítulo III Fig. 3.4 A y B), y en la recuperación de la fotosíntesis (Capítulo III Fig. 3.4 C y D) y de los valores de *Fv/Fm* (Capítulo III Fig. 3.4 E y F). Esto permite no rechazar la *Hipótesis 2.1* “*A través de aplicaciones exógenas de citocininas, que aumentan la concentración de las mismas en*

*hojas, se puede revertir y/o demorar el proceso de inicio de senescencia.”*. Las respuestas a las aplicaciones exógenas de citocininas fueron consistentes con la noción del enlace entre el inicio de la senescencia de la raíz y el inicio de la senescencia foliar mediado por la concentración ( $\text{ng.ml}^{-1}$ recogido) y cantidades recogidas ( $\text{ng.minuto}^{-1}$ ) de citocininas totales en el fluido xilemático. Además, mediante las aplicaciones exógenas se pudo observar que en los dos híbridos el inicio de la senescencia foliar se asoció a umbrales de trans-Zeatina muy diferentes entre híbridos (Capítulo III, Fig. 3.3 y 3.4) resultado confirmado al estudiar las dinámicas de trans-Zeatina en hojas de diferentes posiciones. Dicho valor umbral para las posiciones 17, 20, 22, 24 y 27, respectivamente, fue de 245, 232, 167, 101 y 93  $\text{ng.g}^{-1}$  de peso fresco para el híbrido FDD y de 542, 705, 694, 806, 896  $\text{ng.g}^{-1}$  de peso fresco para el híbrido SG (Capítulo II, Panel A de las Figs. 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8, y Cuadro A1.3 del Apéndice I). La diferencia en los umbrales, entre los híbridos, es coincidente con la diferencia en la dinámica de la DLRV, en el hecho que el SG tiene mayor DLRV por más tiempo (Capítulo II Fig. 2.2); aunque las diferencias entre los híbridos, en la concentración y en las cantidades recogidas de citocininas totales en el fluido xilemático, no fueron proporcionales a las diferencias en la DLRV. Posiblemente esto se encuentre relacionado con que el SG produzca más citocininas por unidad de DLRV (Capítulo III, Cuadro 3.2). Además las diferencias en las citocininas foliares entre híbridos no son proporcionales a las diferencias en la concentración de citocininas totales en el fluido xilemático. Esto es sumamente novedoso, ya que no se ha observado antes, tanto en girasol como en cualquier otra especie de cultivo, y sugiere que la simple comparación de las concentraciones de trans-Zeatina, no constituyen una explicación completa y que las diferencias entre híbridos en la sensibilidad de los tejidos foliares a las concentraciones de trans-Zeatina deben tenerse en cuenta en futuras investigaciones.

El impacto de la alteración en la partición de los hidratos de carbono a favor del sistema radical, repercutió en mayores niveles de DLRV (Capítulo IV Fig. 4.1 A y B, Imágenes 4.3 y 4.4), y en un incremento en las concentraciones ( $\text{ng.ml}^{-1}$ recogido) y cantidades recogidas ( $\text{ng.minuto}^{-1}$ ) de citocininas en el fluido xilemático (Capítulo IV Fig. 4.6 A y B). Ello, a su vez, marcó diferencias importantes en las concentraciones iniciales de trans-Zeatina a nivel de hoja en todas las posiciones foliares muestreadas (Capítulo IV Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, paneles A y B) en ambos híbridos, siendo mayores dichas diferencias en el híbrido FDD. El inicio de la senescencia foliar (caídas en las variables clorofila total, fotosíntesis neta y en  $Fv/Fm$ ), en el tratamiento desgranado y en las posiciones estudiadas, ocurrió recién después de que los valores de trans-Zeatina descendieron hasta los valores umbrales de trans-Zeatina estimados en el Capítulo III (Capítulo IV paneles A [FDD] y B [SG] de las Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12). Esto provocó un retraso en el inicio de la senescencia foliar a nivel de canopeo (Capítulo IV Fig. 4.7 A y B) y a nivel de hoja en todas las posiciones (Capítulo IV Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12, paneles C, D, E, F, G y H). Lo expuesto permite no rechazar la *Hipótesis 3.1 “Alteraciones en el coeficiente de partición de hidratos de carbono a favor del sistema radical, provocará una mayor concentración de citocininas en el fluido xilemático y a nivel de hoja.”*. Nuestra explicación sugerida para el control de la senescencia foliar en estos híbridos de patrones contrastantes es apropiada, ya que los niveles más altos de DLRV durante todo el período de medición en el tratamiento desgrane (Capítulo IV Fig. 4.1 A y B) fueron un factor clave que contribuyó a la diferencia en las concentraciones foliares de trans-Zeatina entre tratamientos. Entre los antecedentes bibliográficos encontramos algunas similitudes parciales con nuestros resultados. Srivalli et al. [2009] documentaron que la eliminación de la espiga en trigo promovió el crecimiento radical. Henzell y Gillieron [1973] encontraron disminuciones

en la tasa de senescencia foliar al eliminar la panoja en sorgo, y Noodén et al. [1990] documentaron incrementos en las concentraciones de citocininas en el fluido xilemático en soja al remover los frutos. En ninguno de estos trabajos se estudió el efecto de la eliminación del fruto sobre todas las variables evaluadas en esta tesis que permitieron caracterizar la senescencia a nivel de planta entera, durante el período de llenado de frutos, en el contexto de dos híbridos de patrones contrastantes de senescencia foliar. Además es de suma importancia destacar que en los tratamientos desgranados las caídas en las variables clorofila total, fotosíntesis neta y en  $F_v/F_m$  (inicio de senescencia foliar) ocurrieron después de que los valores de trans-Zeatina descendieran a los valores umbrales de trans-Zeatina estimados para cada posición en tratamientos controles (Capítulo IV Figs. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12). Esto no deja dudas acerca de que el inicio de este proceso se encuentra relacionado con un umbral mínimo de trans-Zeatina. Esto tampoco está documentado en la bibliografía, y es de una gran relevancia.

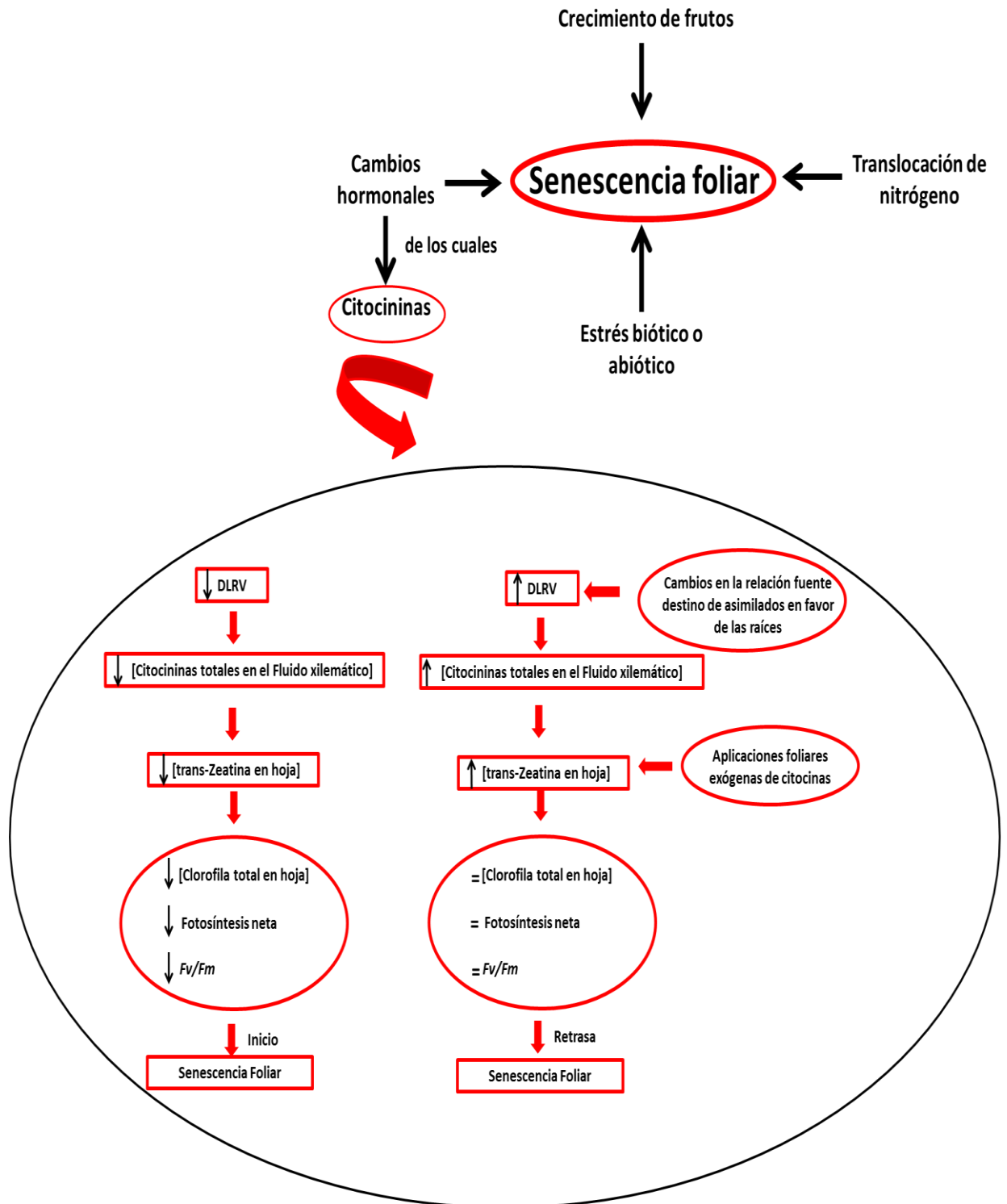
### 5.3 Conclusión

Los experimentos informados en esta tesis demuestran el papel fundamental de la dinámica de la concentración de citocininas foliares y en fluido xilemático en el control de la senescencia foliar en híbridos de girasol con patrones de senescencia foliar contrastante durante el llenado de frutos (Fig. 5.1) puesto que:

- Ratifican que las raíces comienzan a “senescer” antes que el canopeo foliar.
- Establecen la consistencia entre la dinámica de la DLRV post-antesis y la de las concentraciones de citocininas en el fluido xilemático.
- Establecen la asociación entre las dinámicas de las concentraciones de citocininas en el fluido xilemático y la de las hojas.
- Indican un umbral de citocininas a nivel foliar por debajo del cual se desencadena el proceso de senescencia foliar, el cual es muy diferente entre híbridos con senescencia foliar contrastantes.
- Demuestran que la dinámica de la fotosíntesis neta, del rendimiento cuántico del PSII y de la clorofila total se asocian positivamente con la de trans-Zeatina en ambos híbridos.
- Ratifican la participación de las citocininas en el inicio de la senescencia foliar en girasol.
- Sirven de fundamento para un modelo que explica en parte el control del proceso de senescencia foliar en girasol durante el llenado de frutos que echa luz sobre:
  - El comportamiento diferencial entre los híbridos SG y FDD.
  - Que los cambios en la partición de los hidratos de carbono a favor de las raíces afectan el inicio de la senescencia foliar.

La presente tesis arroja un modelo (Fig. 5.1) que pretende explicar el proceso de senescencia durante el período comprendido entre floración y madurez fisiológica, que tiene similitudes y diferencias según sean SG y FDD. Con la disminución en la DLRV, disminuyen los potenciales sitios de síntesis de citocininas, generando una disminución de la concentración de citocininas totales en el fluido xilemático que repercute en una caída de la concentración de trans-Zeatina foliar por debajo de un umbral mínimo. Esto desencadena en la hoja la caída de la concentración de clorofila total, de la fotosíntesis

neta y del parámetro  $F_v/F_m$ , dando inicio al proceso de senescencia foliar. Es importante resaltar que, los resultados de esta tesis sugieren que las diferencias existentes entre los híbridos (SG y FDD), están dadas porque el SG tiene una mayor DLRV que repercute en la mayor concentración de citocininas totales en el fluido xilemático y de trans-Zeatina a nivel foliar. Sin embargo, no se puede descartar la existencia de un retrocontrol interno que regule la biosíntesis de citocininas a nivel de raíces, el cual se dispare a partir de la cantidad de citocininas totales que se mueven a nivel del xilema. Este retrocontrol, puede que sea mayor en el híbrido FDD provocando una drástica disminución en la biosíntesis de citocininas a nivel radical en comparación con el híbrido SG. Asimismo, bajo la condición de desgrane, dicho retrocontrol puede haberse distorsionado o perdido, provocando que las raíces sigan biosintetizando citocininas en etapas avanzadas del llenado de frutos. Tampoco se puede descartar la existencia de diferencias en el catabolismo de citocininas. Los mayores niveles de trans-Zeatina alcanzados en las hojas del híbrido SG luego de la primera aplicación exógena de citocininas, sugieren que el catabolismo de citocininas es menor en este híbrido. Como consecuencia de las diferencias en la DLRV entre híbridos, se observa un retraso en la caída de la concentración de clorofila total, de la fotosíntesis neta y del parámetro  $F_v/F_m$ , retrasando el inicio de la senescencia foliar. El modelo puesto a prueba demostró ser consistente ya que las respuestas, ante las aplicaciones foliares exógenas de citocininas como ante los cambios en la relación fuente destino de asimilados en favor de las raíces, fueron coherentes con el modelo planteado. Ante las aplicaciones exógenas, se incrementó la concentración de trans-Zeatina a nivel foliar generando un retraso en el inicio de la senescencia por el mantenimiento en el tiempo de la concentración de clorofila total, de la fotosíntesis neta y del parámetro  $F_v/F_m$ . La alteración en la relación fuente destino de asimilados a favor de las raíces provocó un incremento en la DLRV y un retraso en el inicio de la senescencia radical. Esto generó un incremento en la concentración de citocininas totales en el fluido xilemático y de trans-Zeatina en hoja. Como consecuencia de ello se mantuvieron en el tiempo la concentración de clorofila total, la fotosíntesis neta y el parámetro  $F_v/F_m$ , retrasando el inicio de la senescencia foliar. La caída en estos parámetros se generó cuando la concentración de trans-Zeatina en hoja llegó a los valores umbrales determinados en los tratamientos control.



**Fig. 5.1.** Esquema integrativo de los resultados. En la parte superior se encuentran los factores que afectan la senescencia foliar (flechas negras hacia el proceso), y en la parte inferior, el modelo que se desprende a partir de la presente tesis centrada en el papel de las citocininas. Dentro del mismo los conjuntos en la columna izquierda indican la situación de planta intacta, y en la derecha la situación de desgrane. En el modelo las flechas rojas indica efecto sobre, y las flechas negras si dicho efecto es positivo (hacia arriba), negativo (hacia abajo) o neutro (signo =).

## 5.4 Vista prospectiva

Se sabe que el rasgo SG influye en el funcionamiento del cultivo durante el llenado de los frutos. Lisanti et al. (2013) han demostrado, tanto en condiciones de sequía como en condiciones de riego, que un híbrido de girasol SG ha mantenido mayores tasas de extracción de agua durante más tiempo después de la floración que un híbrido FDD, comportamiento que tiene efectos positivos sobre el rendimiento de grano (Lisanti, comunicación personal); de la Vega et al. (2011) han demostrado en girasol que los híbridos SG acumulan mayor biomasa durante el llenado de los frutos; y Borrell et al. (2001) encontraron en híbridos de sorgo que los de carácter SG siguen acumulando nitrógeno en etapas avanzadas del llenado de frutos y que las hojas tienen mayor nitrógeno foliar específico. De acuerdo a los resultados de Lisanti et al. (2013) y de Mangieri et al. (2017), la senescencia foliar post antesis en girasol es posterior al inicio de la senescencia radical. Una potencial explicación para esto podría ser que cuando se inicia el llenado de los frutos hay una competencia entre destinos que produce un cambio en la partición de los hidratos de carbono producidos a nivel de hoja y en la utilización de aquellos acumulados durante la prefloración en el tallo. Los destinos que son prioritarios aumentan en el porcentaje de la partición y se disminuye la distribución hacia los otros órganos, entre los cuales se encuentra el sistema radical. Si bien no se conoce con detalle la cadena causal del inicio de la senescencia radical, los trabajos de Bingham (2012) y Bingham y Rees (2008) en raíces de trébol aluden a que en la medida que se reduce la llegada a las mismas de hidratos de carbono y disminuyen los niveles de aquellos de reserva, se afectan los procesos de mantenimiento y se inicia el proceso de senescencia radical. Es por ello que al producirse una competencia desigual entre frutos y sistema radical, por los hidratos de carbono presentes, conlleva a que las raíces inicien antes su proceso de senescencia. Las raíces son los centros de síntesis de citocininas, las cuales se mueven por el fluido xilemático hacia la parte aérea y se acumulan en hojas en diferentes concentraciones de acuerdo a la posición. Cuando las concentraciones de citocininas en hojas se ubican por debajo de un determinado umbral se inicia el proceso de senescencia foliar con la consecuente degradación de estructura y exportación de elementos móviles (i.e nitrógeno) hacia los centros en activo crecimiento. A estas diferencias en la partición de la materia seca debemos agregar que los frutos son destinos activos de nitrógeno durante la etapa de llenado. El nitrógeno puede provenir de la removilización de lo acumulado en prefloración-floración o bien de lo absorbido durante el llenado de los frutos. Tanto en trigo (Gaju et al. 2014) como en maíz (Peng Ning et al. 2013), en condiciones normales de contenido de nitrógeno en el suelo, se ha demostrado que los materiales SG son más eficientes en la absorción de nitrógeno durante el llenado de frutos que los materiales FDD. Esto reduce el porcentaje de removilización desde otros órganos, determinando que el nitrógeno proveniente desde las hojas que han iniciado su senescencia, más el absorbido, satisfagan la demanda de los frutos; mientras que en el caso de los FDD esto no ocurre, determinando que se acelere el proceso de senescencia de la parte aérea. Frente a situaciones de deficiencias de nitrógeno en el suelo se produce una aceleración de la senescencia en los dos materiales. Las diferencias observadas entre el FDD y el SG podrían explicarse desde este punto de vista. Los materiales SG, por tener un mayor IAF (índice de área foliar) durante el llenado de los frutos y a igualdad de condiciones, producen más materia seca y particionan más carbohidratos hacia las raíces. Esto retrasa el inicio de la senescencia radical repercutiendo en un sistema radical más robusto, con mayor síntesis de citocininas, lo que conlleva alcanzar y mantener umbrales más altos a

nivel de hojas y retrasar el inicio de la senescencia foliar. Además ese mayor sistema radical permite una mayor absorción de nitrógeno que, conjuntamente con el proveniente de la senescencia foliar, satisface la demanda de los frutos en condiciones normales, sin alterar el inicio o la tasa de senescencia por una situación de déficit interno de nitrógeno.

Cuando se varía la relación fuente destino de carbono a través del desgrane, el sistema radical se convierte en el destino prioritario de los hidratos de carbono producidos y ello lleva a aumentar el crecimiento del mismo con aumentos significativos en los niveles de citocininas que se mueven hacia la parte aérea, y que se acumulan en las hojas. Esto retrasa el inicio de la senescencia foliar, pues se demora el momento en el cual se alcanza el umbral por debajo del cual se inicia el proceso de senescencia foliar. El desplazamiento en el tiempo del inicio de la senescencia radical tanto en el FDD como en el SG puede deberse a factores genéticos o genéticos ambientales. Un efecto similar encontraron Chimenti et al. (2014) también variando la relación fuente destino pero en este caso a través del agregado de sacarosa en genotipos FDD sin variar el número de frutos. El aumento de los niveles de hidratos de carbono disponible por planta no solo mejoró el peso seco final de los frutos sino que también aumentó la cantidad de biomasa particionada hacia las raíces. Esto provocó un aumento del sistema radical cuyo efecto fue un retraso en el inicio de la senescencia foliar en estas plantas en comparación con aquellas en condiciones normales. Respecto a las aplicaciones exógenas de citocininas, se ha encontrado que retrasan la senescencia foliar en híbridos FDD y SG, generando incrementos en el rendimiento en grano (Chimenti, comunicación personal).

Si bien lo descrito hasta aquí permite explicar con cierto detalle una asociación entre el sistema radical, la síntesis de citocininas, la removilización/absorción de nitrógeno y el inicio de la senescencia, no significa que no existan otros factores que integren este rompecabezas sobre la senescencia foliar durante la etapa de llenado de frutos.

Se está estudiando el control de la senescencia foliar a nivel molecular identificando factores de transcripción, biomarcadores y genes candidatos asociados al proceso (López Gialdi et al. 2016; Moschen et al. 2014, 2016a, 2016b). Asimismo se buscaron marcadores para identificar genotipos con senescencia de carácter SG (López Gialdi et al. 2016). En estos estudios se encontraron asociaciones entre patrones de expresión a nivel foliar de dos factores de transcripción y el patrón de senescencia foliar medidos 5 días después de anthesis en uno de los dos pares SG/FDD examinados. Estos estudios no exploraron efectos ligados a la senescencia radical y el modelo experimental utilizado tiene diferencias importantes con respecto a un cultivo comercial (e.g., uso de líneas endocriadas, de muy bajo GLAI máximo [menores a 1.7], parcelas de un solo surco, muestreo limitado a la hoja de posición 10 en plantas con 19 a 29 hojas totales, etc. etc.). En base a los resultados presentados a lo largo de esta tesis, se debe asumir que al investigar sobre la senescencia foliar, no se puede dejar de lado lo que está sucediendo a nivel radical, por lo tanto es de suma importancia que futuros estudios se enfoquen en analizar también lo que sucede con la expresión génica a este nivel.

Los resultados de esta tesis ubican a las citocininas como la señal a partir de la cual se inicia el proceso de senescencia foliar. Esto contrasta con la opinión de la escuela que percibe al nitrógeno como la señal responsable del inicio de la senescencia foliar (Sinclair y de Wit, 1976, soja; Sinclair y Horie, 1989, soja arroz y maíz; Van Oosterom et al., 2010, sorgo). El hecho de que Van Oosterom et al. (2010) haya encontrado que en sorgo los materiales SG siguen absorbiendo nitrógeno durante la etapa de posfloración, coincide con los resultados en materia de funcionalidad radical

presentados en esta tesis. No obstante, establecen una cadena causal del proceso de senescencia foliar diferente, indicando que la misma se desencadena por la mayor demanda de nitrógeno por parte de los frutos, provocando una traslocación diferencial hacia estos, y como consecuencia de ello senescen las hojas en primer lugar, y finalmente las raíces. Nuestros resultados demuestran que la cadena causal es diferente, ya que establece que a partir de la partición diferencial de carbono en favor de los frutos, las raíces senescen en primer lugar, provocando una caída en la concentración de citocininas en el fluido xilemático y a nivel de hoja, desencadenando finalmente el inicio de la senescencia foliar. Sería importante, a futuro, explorar en forma paralela en un modelo experimental similar al utilizado para esta tesis las dinámicas de la DLRV, del IAFV, y de citocininas y nitrógeno a nivel foliar.

Nuestros resultados avanzan en la comprensión actual, tanto a nivel de cultivo como de hoja, de los controles y las consecuencias del carácter SG durante el llenado de los frutos, y aportan evidencia adicional de que valen la pena los esfuerzos de mejoramiento que apuntan a aprovechar este rasgo para aumentar los rendimientos de los cultivos. Esta tesis cumplió con el objetivo general, y por primera vez se logró ubicar a las citocininas en el proceso de senescencia a nivel de planta entera. No obstante creo que aún queda un camino por recorrer con el objetivo de dilucidar cuestiones tales como:

- establecer la existencia de una sensibilidad diferencial, o no, a nivel foliar de los receptores de citocininas entre híbridos con comportamiento contrastante a la senescencia foliar;
- establecer la existencia de una diferencia, o no, de los procesos de degradación de las citocininas a nivel foliar;
- establecer la existencia de una posible relación entre los umbrales de citocininas y el incremento de los niveles de etileno en las hojas (Lim et al., 2007);
- hallar las causas del incremento abrupto, no asociado con un cambio proporcional en la DLRV, en la concentración de trans-Zeatina en el fluido xilemático en el período cercano a antesis.
- documentar, en forma paralela y usando un modelo experimental similar al aquí utilizado, las economías de citocininas y nitrógeno a nivel foliar y de planta entera.

Estas cuestiones merecen ser atendidas en investigaciones futuras.



## Referencias Bibliográficas

---

- Acciaresi, H. A., Tambussi, E. A., Antonietta, M., Zuluaga, M. S., Andrade, F. H., and Guiamét, J. J. 2014. Carbon assimilation, leaf area dynamics, and grain yield in contemporary earlier-and later-senescing maize hybrids. *European journal of agronomy*, 59, 29-38.
- Akiyoshi, D.E., Morris, R.O., Hinz, R., Mischke, B.S., Kosuge, T., Garfinkel, D.J., Gordon, M. P., Nester, E.W. 1983. Cytokinin/auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 407-411.
- Akiyoshi, D.E., Klee, H., Amasino, R.M., Nester, E.W., Gordon, M.P. 1984. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81: 5994-5998.
- Ambler, J.R., Morgan, P.W., Jordan, W.R. 1992. Amounts of zeatin and zeatin riboside in xylem sap of senescent and nonsenescent sorghum. *Crop Science*, 32: 411-419.
- Anderson, J. M., Park, Y. I., and Chow, W. S. 1997. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in the nature. *Physiologia Plantarum*, 100: 214-223.
- Angadi, S.V., and Entz, M.H. 2002. Root system and water use patterns of different height sunflower cultivars. *Agronomy Journal*, 94: 136-145.
- Antonietta, M., Fanello, D. D., Acciaresi, H. A., Guiamet, J. J. 2014. Senescence and yield responses to plant density in stay green and earlier-senescing maize hybrids from Argentina. *Field Crops Research*, 155: 111-119.
- Archontoulis, S. V., Vos, J., Yin, X., Bastiaans, L., Danalatos, N. G., & Struik, P. C. 2011. Temporal dynamics of light and nitrogen vertical distributions in canopies of sunflower, kenaf and cynara. *Field Crops Research*, 122: 186-198.
- Argueso, C. T., Ferreira, F. J., & Kieber, J. J. 2009. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, cell & environment*, 32: 1147-1160.
- Armstrong, D. J. 1994. Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. CRC Press, Boca Raton, FL, 139-154.
- Balibrea Lara, M. E., Gonzales Garcia M. C., Fatima T., Ehness R., Lee T. K., Proels, R., Tanner W., and Roitsch, T. 2004. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin- mediated delay of senescence. *Plant Cell*, 16: 1276-1287.
- Bano, A., Hansen, H., Dörffling, K., & Hahn, H. 1994. Changes in the contents of free and conjugated abscisic acid, phaseic acid and cytokinins in xylem sap of drought stressed sunflower plants. *Phytochemistry*, 37: 345-347.
- Barry, G.F., Rogers, S.G., Fraley, R.T., Brand, L. 1984. Identification of cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81: 4776-4780.
- Beveridge, C.A., Murfet, I.C., Kerhoas, L., Sotta, B., Miginiac, E., Rameau, C. 1997. The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant rms4. *The Plant Journal*, 11: 339-345.
- Bingham, I. J. 2012. Factors affecting the longevity of clover roots following shoot excision and its implications for managing N cycling in arable cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry* 50: 199-207.

- Bingham, I. J., & Rees, R. M. 2008. Senescence and N release from clover roots following permanent excision of the shoot. *Plant and soil*, 303: 229-240.
- Bilger, W., Schreiber, U., Bock, M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia*, 102: 425-432.
- Borrás, L., Maddonni, G.A., and Otegui, M.E. 2003. Leaf senescence in maize hybrids: plant population row spacing and kernel set effects. *Field Crops Research*, 82: 13-26.
- Borrell, A., Hammer, G., and Van Oosterom, E. 2001. Stay green: A consequence of the balance between supply and demand for nitrogen during grain filling?. *Annals of Applied Biology*, 138: 91-95.
- Buchanan- Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T., and Pink, D. 2003. The molecular analysis of leaf senescence- a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 3-22.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., Lin J.-F., Wu S.-H., Swidzinski J., Ishizaki K., Leaver, C. J. 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 42: 567-585.
- Cantagallo, J., Hall, A.J. 2002. Seed number in sunflower as affected by light stress during the floret differentiation interval. *Field Crops Research*, 74: 173-181.
- Cantagallo, J.E., Medan, D., Hall, A.J. 2004. Grain number in sunflower as affected by shading during floret growth, anthesis and grain setting. *Field Crops Research*, 85: 191-202.
- Chimenti, C., Datsira, R., Lisanti, S. 2014. Modificaciones en las relaciones Fuentes/destino de fotoasimilados durante el llenado de frutos en girasol y su efecto sobre la funcionalidad del sistema radical. XV Congreso Latinoamericano, XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata, Argentina, 21-24 de Septiembre de 2014.
- Connor, D. J., Hall, A. J., and Sadras, V. O. 1993. Effect of nitrogen content on the photosynthetic characteristics of sunflower leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 20, 251-263.
- Conrad, K., Motyka, V., Bernhardt, R., Stein, C. 2015. Cytokinin dynamics in differently senescing laminae of *Phragmites australis* plants grown in different habitats. *South African Journal of Botany*, 99: 54-61.
- Constable, G.A. and Rawson H.M., 1980. Carbon production and utilization in cotton: Inferences from carbon budget. *Australian Journal of Plant Physiology* 7: 535-553.
- De la Vega, A. J., Cantore, M.A., Sposaro, M.M., Trápani, N., López Pereira M., and Hall, A.J. 2011. Canopy stay-green and yield in non-stressed sunflower. *Field Crops Research*, 121: 175-185.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. 2010. InfoStat version 2010. InfoStat Group, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dosio, G., Popovich, J., Lorenzo, M. y Aguirrezabal, L. 2010. Cronología de eventos relacionados con la senescencia foliar en girasol. 5to. Congreso Argentino de girasol, ASAGIR, 1-2 de Junio 2010. Resúmenes 5to. Congreso Argentino de Girasol p.303.
- Fernández, M. A., Gyenge, J.E. 2010. Técnicas de medición en Ecofisiología Vegetal. Conceptos y Procedimientos. Ediciones INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Buenos Aires, Argentina.

- Gaju, O., Allard, V., Martre, P., Le Gouis, J., Moreau, D., Bogard, M., Hubbart, S., & Foulkes, M. J. 2014. Nitrogen partitioning and remobilization in relation to leaf senescence, grain yield and grain nitrogen concentration in wheat cultivars. *Field Crops Research*, 155: 213-223.
- Gan, S., and Amasino, R.M. 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270: 1986-1988.
- Gan, S., and Amasino, R.M. 1997. Making Sense of Senescence. *Plant Physiology*, 113: 313-319.
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., & Frugier, F. 2006. The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Cell*, 18: 2680-2693.
- Gregersen, P. L., Holm, P. B., and Krupinska, K. 2008. Leaf senescence and nutrient remobilization in barley and wheat. *Plant Biology*, 10: 37-49.
- Gregory, P.J., McGowan, M., Biscoe, P.V. and Hunter, B. 1978. Water relations of winter wheat. 1. Growth of the root system. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 91: 91-102.
- Guamét, J. J., Willemoes, J. G., and Montaldi, E. R. 1989. Modulation of progressive leaf senescence by the red:far-red ratio of incident light. *Botanical Gazette*, 150: 148-151.
- Guamét, J.J., Pichersky, E., Noodén, L.D., 1999. Mass exodus from senescing soybean chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 40: 986-992.
- Guiboileau, A., Sormani, R., Meyer, C., Masclaux-Daubresse, C. 2010. Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus Biologies*, 333: 382-391.
- Hall, A., Connor, D and Whitfield, D. 1989. Contribution of pre-anthesis assimilates to grain-filling in irrigated and water-stressed sunflowers crops I. Estimates using labeled carbon. *Field Crops Research*, 20: 95-112.
- Hall, A.J., Connor, D.J., Whitfield, D.W. 1990. Root respiration during grain filling in sunflower: the effects of water stress. *Plant Soil*, 121: 57-66.
- Hargreaves, G. H., and Samani, Z. A. 1985. Reference crop evapotranspiration from temperature. *Applied Engineering in Agriculture*, 1: 96-99.
- He, Y., Tang, W., Swain, J. D., Green, A. L., Jack, T. P., and Gan, S. 2001. Networking Senescence-Regulating Pathways by Using Arabidopsis Enhancer Trap Lines. *Plant Physiology*, 126: 707-716.
- Henzell, R.G., Gillieron, W. 1973. Effect of partial and complete panicle removal on the rate of death of some *Sorghum bicolor* genotypes under moisture stress. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 30: 294-299.
- Hoyerová, K., Gaudinová, A., Malbeck, J., Dobrev, P., Kocábek, T., Šolcová, B., Trávníčková, A., Kamínek, M. 2006. Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry*, 67: 1151-1159.
- Inskip, W.P., Bloom, P.R. 1985. Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone. *Plant Physiology*, 77: 483-485.
- Itai, C., and Vaadia, Y. 1971. Cytokinin activity in water-stressed shoots. *Plant Physiology*, 47: 87-90.
- Kjelgaard, J., Stockle, C.O., Black, R.A., and Campbell, G.S. 1996. Measuring sap flow with the heat balance approach using constant and variable heat inputs. *Agricultural and Forest Meteorology*, 85: 239-250.

- Lamattina, L., Pont Lezica, R., and Conde, R. D. 1985. Protein metabolism in senescing wheat leaves. Determination of synthesis and degradation rates and their effects on protein loss. *Plant Physiology*, 77: 587-590.
- Letham, D. S. 1994. Cytokinins as phytohormones: sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. *Cytokinins: chemistry, activity, and function*. CRC Press, Boca Raton, FL, 57-80.
- Lim, P.O., Kim, H.J., and Nam, H.G. 2007. Leaf Senescence. *The Annual Review of Plant Biology*, 58: 115-36.
- Lindström, L. I., Pellegrini, C. N., Aguirrezábal, L. A. N., & Hernández, L. F. 2006. Growth and development of sunflower fruits under shade during pre and early post-anthesis period. *Field crops research*, 96: 151-159.
- Lisanti, S., Cabarcos, J.M., Hall, A.J. and Chimenti, C. 2012. Changes in source-sink relationships during grain-filling and its effects on sunflower root system viability and canopy functionality. 18th International Sunflower Conference, pp. International Sunflower Association: Mar del Plata, Argentina, 26 Febrero- 01 de Marzo 2012.
- Lisanti S., Hall A.J., & Chimenti C.A. 2013. Influence of water deficit and canopy senescence pattern on *Helianthus annuus* (L.) root functionality during the grain-filling phases. *Field Crops Research* 154: 1-11.
- Liu L., Li H., Zeng H., Cai Q., Zhou X. & Yin C. 2016. Exogenous jasmonic acid and cytokinin antagonistically regulate rice flag leaf senescence by mediating chlorophyll degradation, membrane deterioration, and senescence-associated genes expression. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35: 366-376.
- Lohar, D. P., Schaff, J. E., Laskey, J. G., Kieber, J. J., Bilyeu, K. D., & Bird, D. M. 2004. Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *The Plant Journal*, 38: 203-214.
- Lopes, M. S., Reynolds, M. P. 2012. Stay-green in spring wheat can be determined by spectral reflectance measurements (normalized difference vegetation index) independently from phenology. *Journal of Experimental Botany*, 63: 3789-3798.
- López Gialdi, A. I., Moschen, S., Villán, C. S., López Fernández, M. P., Maldonado, S., Paniego, N., Heinz R.A., & Fernandez, P. 2016. Identification and characterization of contrasting sunflower genotypes to early leaf senescence process combining molecular and physiological studies (*Helianthus annuus* L.). *Plant Science*, 250: 40-50.
- Majdi, H., Damm, E., and Nylund, J. E. 2001. Longevity of mycorrhizal roots depends on branching order and nutrient availability. *New Phytologist*, 150: 195-202.
- Mangieri, M. A., Hall, A. J., Striker, G. G., & Chimenti, C. A. 2017. Cytokinins: A key player in determining differences in patterns of canopy senescence in Stay-Green and Fast Dry-Down sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids. *European Journal of Agronomy*, 86: 60-70.
- Martínez, D. E., Costa, M. L., Gomez F. M., Otegui, M. S., Guiamet, J. J. 2008. 'Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *The Plant Journal*, 56: 196-206.
- Masferrer, A., Arró, M., Manzano, D., Schaller, H., Fernández-Busquets, X., Monceleán, P., Fernández, B., Cunillera, N., Boronat, Ferrer, A. 2002. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *The Plant Journal*, 30: 123-132.
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K., and Kakimoto, T. 2008. Cytokinins are central

- regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 20027-20031.
- Maxwell, K., Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51: 659-668.
- McCabe, M.S., Garratt, L.C., Schepers, F., Jordi, W.J.R.M., Stoop, G.M., Davelaar, E., Van Rhijn, H. A., Power, J.B., Davey, M.R. 2001. Effects of PSAG12-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiology*, 127: 505-516.
- Mengel, D.B and Barber, S.A. 1974. Development and distribution of the corn root system under field conditions. *Agronomy Journal*, 66: 341-344.
- Moschen, S., Bengoa Luoni, S., Di Rienzo, J. A., Caro, M.D.P., Tohge, T., Watanabe, M., Hollmann, J., González, S., Rivarola, M., García-García, F., Dopazo, J., Hopp, H.E., Hoefge, R., Fernie, A.R., Paniego, N., Fernández, P., Heinz, R.A. 2016<sub>A</sub>. Integrating transcriptomic and metabolomic analysis to understand natural leaf senescence in sunflower. *Plant Biotechnology Journal*, 14: 719-734.
- Moschen, S., Higgins, J., Di Rienzo, J. A., Heinz, R. A., Paniego, N., & Fernandez, P. 2016<sub>B</sub>. Network and biosignature analysis for the integration of transcriptomic and metabolomic data to characterize leaf senescence process in sunflower. *BMC Bioinformatics*, 17: 174.
- Moschen, S., Luoni, S. B., Paniego, N. B., Hopp, H. E., Dosio, G. A., Fernandez, P., & Heinz, R. A. 2014. Identification of candidate genes associated with leaf senescence in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *PloS one*, 9: e104379.
- Neumann, P.M., Stein, Z. 1984. Relative rates of delivery of xylem solute to shoot tissues: Possible relationship to sequential leaf senescence. *Physiologia plantarum*, 62: 390-397.
- Ning, P., Li, S., Yu, P., Zhang, Y., & Li, C. 2013. Post-silking accumulation and partitioning of dry matter, nitrogen, phosphorus and potassium in maize varieties differing in leaf longevity. *Field Crops Research*, 144: 19-27.
- Nieminen, K., Immanen, J., Laxell, M., Kauppinen, L., Tarkowski, P., Dolezal, K., ... & Bhalerao, R. 2008. Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 20032-20037.
- Noodén, L. D. and Guiamét, J. J. 1989. Regulation of assimilation and senescence by the fruit in monocarpic plants. *Physiologia Plantarum*, 77: 267-274.
- Noodén, L. D., Guiamét, J. J., and John, I. 1997. Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum*, 101: 746-753.
- Noodén, L.D., Kahanak, G.M., Okatan, Y. 1979. Prevention of monocarpic senescence in soybeans with auxin and cytokinin: an antidote to self-destruction. *Science*, 206: 841-843.
- Noodén, L. D., and Letham, D. S. 1993. Cytokinin metabolism and signalling in the soybean plant. *Functional Plant Biology*, 20: 639-653.
- Noodén, L. D., Singh, S. and Letham S. 1990. Correlation of Xylem Sap Cytokinin Levels with Monocarpic Senescence in Soybean. *Plant Physiology*, 93: 33-39.
- Ori, N., Juarez, M.T., Jackson, D., Yamaguchi, J., Banowitz, G.M., Hake, S., 1999. Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell*, 11: 1073-1080.
- Pereyra, V.R., Farizo, C., Cardinali, F. 1982. Estimation of leaf area on sunflower plants. In: *Proc. 10th Int. Sunflower Conf. Surfers Paradise, Australia, March 14-18, 1982*, International Sunflower Association, Paris, pp. 21-23.

- Pic, E., de la Serve, B. T., Tardieu, F., and Tur, O. 2002. Leaf senescence induced by mild water deficit follows the same sequence of macroscopic, biochemical, and molecular events as monocarpic senescence in Pea. *Plant Physiology*, 128: 236-246.
- Rajcan, I., Dwyer, L. M., and Tollenaar, M. 1999. Note on relationship between leaf soluble carbohydrate and chlorophyll concentrations in maize during leaf senescence. *Field Crops Research*, 63: 13-17.
- Rajcan, I., and Tollenaar, M. 1999. Source: sink ratio and leaf senescence in maize: I. Dry matter accumulation and partitioning during grain filling. *Field Crops Research*, 60: 245-253.
- Rodríguez, D., Zubillaga, M. M., Ploschuk, E. L., Keltjens, W. G., Goudriaan, J., & Lavado, R. S. 1998. Leaf area expansion and assimilate production in sunflower (*Helianthus annuus* L.) growing under low phosphorus conditions. *Plant and Soil*, 202(1), 133-147.
- Ren B., Zhu Y., Zhang J., Dong S., Liu P. & Zhao B. 2016. Effects of spraying exogenous hormone 6-benzyladenine (6-BA) after waterlogging on grain yield and growth of summer maize. *Field Crops Research*, 188: 96-104.
- Richards, R.A., Watt, M. and Rebetzke, G. 2007. Physiology traits and cereal germplasm for sustainable agricultural systems. *Euphytica*, 154: 409-425.
- Richmond, A.E., Lang, A. 1957. Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science*, 125: 650-651.
- Rousseaux M.C., Hall A.J., Sánchez R.A. 1996. Far-red enrichment and photosynthetically active radiation level influence leaf senescence in field-grown sunflower. *Physiologia Plantarum*, 96: 217-24.
- Rousseaux M.C., Hall A.J., Sánchez R.A. 2000. Basal leaf senescence in a sunflower (*helianthus annuus*) canopy: responses to increased R/RF ratio. *Physiologia Plantarum*, 110: 477-482.
- Sadras, V.O., Hall, A.J., Trapani, N., and Vilella, F. 1989. Dynamics of rooting and root-length: Leaf-area relationships as affected by plant population in sunflower crops. *Field Crops Research*, 22: 45-57.
- Sakakibara, H. 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 431-449.
- Samuelson, M. E. 1992. Nitrate-regulated growth and cytokinin responses in seminal roots of barley. *Plant Physiology*, 98: 309-315.
- Schmitz, R. Y., Skoog, F., Playtis, A. J., & Leonard, N. J. 1972. Cytokinins: synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin. *Plant Physiology*, 50: 702-705.
- Schneiter, A.A. and Miller, J. F. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Science*, 21: 901-903.
- Shashidhar, V. R., Prasad, T. G., & Sudharshan, L. 1996. Hormone signals from roots to shoots of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Moderate soil drying increases delivery of abscisic acid and depresses delivery of cytokinins in xylem sap. *Annals of Botany*, 78: 151-155.
- Shin, J. H., Park, J. S., & Son, J. E. 2014. Estimating the actual transpiration rate with compensated levels of accumulated radiation for the efficient irrigation of soilless cultures of paprika plants. *Agricultural water management*, 135: 9-18.
- Sinclair, T. R., and De Wit, C. T. 1976. Analysis of the carbon and nitrogen limitations to soybean yield. *Agronomy Journal*, 68: 319-324.
- Sinclair, T. R., and Horie, T. 1989. Leaf Nitrogen, Photosynthesis, and Crop Radiation Use Efficiency: A Review. *Crops Science*, 29: 90-98.

- Singh, S., Letham, D. S., and Palni L. M. S. 1992. Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous cytokinin levels and exogenous applications of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. *Physiologia Plantarum*, 86: 388-397.
- Srivalli, S., and Renu, K-C. 2009. Delayed wheat flag leaf senescence due to removal of spikelets is associated with increased activities of leaf antioxidant enzymes, reduced glutathione/oxidized glutathione ratio and oxidative damage to mitochondrial proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 663-670.
- Steinberg, S, van Bavel, C.H.M. and McFarland, M.J. 1989. A gauge to measure mass flow rate of sap in stems and trunks of woody plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114: 466-472.
- Sturite L, Henriksen TM, and Breland TA. 2005. Distinguishing between metabolically active and inactive roots by combined staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride and image colour analysis. *Plant and Soil*, 271: 75-82.
- Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M., and Sugiyama, T. 2001 Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in roots and the translocation to leaf: Implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiology*, 42: 85–93.
- Thomas, H., and Howarth, C. J. 2000. Five ways to stay green. *Journal of Experimental Botany*, Volume 51: 329-337.
- Vamerali, T., Ganis, A., Bona, S., and Mosca, G. 2003. Fibrous root turnover and growth in sugar beet (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*) as affected by nitrogen shortage. *Plant and Soil*, 255: 169-177.
- Van Oosterom, E.J., Chapman, S.C., Borrell, A.K., Broad, I.J., and Hammer, G.L. 2010. Functional dynamics of the nitrogen balance of sorghum. II. Grain filling period. *Field Crops Research*, 115: 29-38.
- Villalobos, F.J., Ritchie, J.T. 1992. The effect of temperature on leaf emergence rates of sunflower genotypes. *Field Crops Research* 29, 37-46.
- Weibel, F.P. and de Vos, J.A. 1994. Transpiration measurements on apple trees with an improved stem heat balance method. *Plant Soil*, 166: 203-219.
- Werner, T. and Schmülling T. 2009. Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 527-538.
- White, P.R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiology*, 9: 585-600.
- Wiedemuth, K., Muller, J., Kahlau, A., Amme, S., Mock H. A., Grzam, A., Hell, R., Egle, K., Beschow, H., and Humbeck, K. 2005. Successive maturation and senescence of individual leaves during barley whole plant ontogeny reveals temporal and spatial regulation of photosynthetic function in conjunction with C and N metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 162: 1226-1236.
- Zubo, Y. O., Yamburenko, M. V., Selivankina, S. Y., Shakirova, F. M., Avalbaev, A. M., Kudryakova, N. V., ... & Börner, T. 2008. Cytokinin stimulates chloroplast transcription in detached barley leaves. *Plant Physiology*, 148: 1082-1093.

## Apéndice I

**Cuadro A1.1.** Valores p resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efecto de los factores híbrido (H) y año (A) y su interacción sobre los parámetros (ordenada al origen, pendiente de la fase inicial, momento de cambio entre las fases y pendiente de la segunda fase) de las funciones bi-lineales ajustadas a la dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) y el índice de área foliar verde (IAFV) (n=5). La interacción H x A no se muestra debido a que no fue significativa ( $p > 0.05$ ) en ningún caso (ns: no significativo  $p > 0.05$ ).

		<i>Valor-p</i>	
		H	A
DLRV	Ordenada al origen	<0.0001	ns
	Pendiente de la fase inicial	ns	ns
	Momento de cambio entre las fases	<0.0001	ns
	Pendiente de la segunda fase	ns	ns
IAFV	Ordenada al origen	<0.0001	ns
	Pendiente de la fase inicial	ns	ns
	Momento de cambio entre las fases	<0.0001	ns
	Pendiente de la segunda fase	ns	ns



**Cuadro A1.2.** Valores p resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efecto de los factores híbrido (H), posición de la hoja (P), año (A) y sus interacciones sobre los parámetros (ordenada al origen, pendiente de la fase inicial, momento de cambio entre las fases y pendiente de la segunda fase) de las funciones bi-lineales ajustadas a la dinámica de la clorofila total, de la fotosíntesis neta, del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) y de la trans-Zeatina (n=5). Las interacciones H x A, P x A y H x P x A no se muestran debido a que no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) en ningún caso (ns: no significativo  $p > 0.05$ ).

		<i>Valor-p</i>			
		H	P	A	H x P
Clorofila Total	Ordenada al origen	ns	ns	ns	ns
	Pendiente de la fase inicial	ns	ns	ns	ns
	Momento de cambio entre las fases	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001
	Pendiente de la segunda fase	0.0321	<0.0001	ns	<0.0001
Fotosíntesis Neta	Ordenada al origen	ns	ns	ns	ns
	Pendiente de la fase inicial	ns	ns	ns	ns
	Momento de cambio entre las fases	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001
	Pendiente de la segunda fase	ns	<0.0001	ns	<0.0001
$F_v/F_m$	Ordenada al origen	ns	ns	ns	ns
	Pendiente de la fase inicial	ns	ns	ns	ns
	Momento de cambio entre las fases	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001
	Pendiente de la segunda fase	ns	<0.0001	ns	<0.0001
trans- Zeatina	Ordenada al origen	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001
	Pendiente de la fase inicial	ns	ns	ns	ns
	Momento de cambio entre las fases	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001
	Pendiente de la segunda fase	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001

**Cuadro A1.3.** Contraste entre años para las funciones ajustadas a la dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) (a), del índice de área foliar verde (IAFV) (b), y de los indicadores de funcionalidad foliar: concentración de clorofila total (c), fotosíntesis neta (d), rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) (e) y concentración de trans-Zeatina (f), para las posiciones foliares 17, 20, 22, 24 y 27 en un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG). Se muestran los valores de los cuatro parámetros de las funciones bi-lineales (ordenada al origen, pendiente de la fase inicial, momento de cambio entre las fases y pendiente de la segunda fase), ajustadas a cada relación variable/Momento en los dos años ( $n = 5$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre años, y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre híbridos en cada posición foliar. Las mediciones se tomaron desde el principio de antesis, hasta algunos días después de la madurez fisiológica. DDIA significa "días desde el inicio de antesis", y "TT ( $^{\circ}\text{C}\text{día}$ ,  $T_b=4^{\circ}\text{C}$ )" Tiempo térmico desde que la máxima expansión de las hojas fue alcanzada en cada posición.

a) DLRV	Ordenada al origen $\text{cm.cm}^{-3}$	Pendiente de la fase inicial $\text{cm.cm}^{-3}.\text{día}^{-1}$	Momento de cambio entre las fases (DDIA)	Pendiente de la 2 <sup>o</sup> fase $\text{cm.cm}^{-3}.\text{día}^{-1}$	$R^2$
FDD (Año 1)	0,34 a B	4,46E-03 a A	5 a B	-0,074 a A	0.91
FDD (Año 2)	0,32 a B	3,95E-03 a A	7 a B	-0,055 a A	0.86
SG (Año 1)	0,42 a A	4,69E-03 a A	12 a A	-0,073 a A	0.92
SG (Año 2)	0,39 a A	4,21E-03 a A	10 a A	-0,066 a A	0.88

b) IAFV	Ordenada al origen IAFV	Pendiente de la fase inicial IAFV. $\text{día}^{-1}$	Momento de cambio entre las fases (DDIA)	Pendiente de la 2 <sup>o</sup> fase IAFV. $\text{día}^{-1}$	$R^2$
FDD (Año 1)	5,35 a B	-4,41E-12 a A	12 a B	-0,1095 a A	0.98
FDD (Año 2)	5,28 a B	-4,45E-11 a A	16 a B	-0,1059 a A	0.97
SG (Año 1)	5,89 a A	4,19E-11 a A	18 a A	-0,0935 a A	0.99
SG (Año 2)	5,72 a A	6,02E-11 a A	22 a A	-0,0988 a A	0.99

**Cuadro A1.3.**  
**(Continuación)**

c) Clorofila Total	Ordenada al origen  mg.g <sup>-1</sup> pesofresco	Pendiente de la fase inicial  mg.g <sup>-1</sup> .pesofresco.°Cdía <sup>-1</sup>	Momento de cambio		Pendiente de la 2º fase mg.g <sup>-1</sup> .pesofresco.°Cdía <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>
			entre las fases TT (°Cdía) desde máxima expansión			
FDD H 17 (Año 1)	2,67 a A	1,24E-12 a A	449 a B		-0,0038 a A	0.94
FDD H 17 (Año 2)	2,67 a A	1,35E-12 a A	468 a B		-0,0039 a A	0.95
FDD H 20 (Año 1)	2,69 a A	-1,61E-04 a A	465 a B		-0,0032 a A	0.97
FDD H 20 (Año 2)	2,65 a A	-1,74E-04 a A	475 a B		-0,0033 a A	0.93
FDD H 22 (Año 1)	2,66 a A	-2,24E-05 a A	508 a B		-0,0058 a B	0.99
FDD H 22 (Año 2)	2,68 a A	-2,39E-05 a A	525 a B		-0,0063 a B	0.98
FDD H 24 (Año 1)	2,67 a A	-4,62E-05 a A	464 a B		-0,0086 a B	0.99
FDD H 24 (Año 2)	2,66 a A	-4,76E-05 a A	493 a B		-0,0089 a B	0.98
FDD H 27 (Año 1)	2,69 a A	5,96E-11 a A	507 a B		-0,0041 a A	0.98
FDD H 27 (Año 2)	2,72 a A	6,43E-11 a A	528 a B		-0,0043 a A	0.98
SG H 17 (Año 1)	2,68 a A	-1,74E-13 a A	500 a A		-0,0055 a B	0.99
SG H 17 (Año 2)	2,68 a A	-1,91E-13 a A	521 a A		-0,0058 a B	0.96
SG H 20 (Año 1)	2,66 a A	-6,19E-06 a A	660 a A		-0,0054 a B	0.99
SG H 20 (Año 2)	2,67 a A	-6,68E-06 a A	694 a A		-0,0059 a B	0.95
SG H 22 (Año 1)	2,70 a A	1,02E-04 a A	561 a A		-0,0041 a A	0.97
SG H 22 (Año 2)	2,72 a A	1,05E-04 a A	596 a A		-0,0044 a A	0.99
SG H 24 (Año 1)	2,72 a A	5,62E-08 a A	567 a A		-0,0075 a A	0.99
SG H 24 (Año 2)	2,73 a A	5,68E-08 a A	586 a A		-0,0081 a A	0.97
SG H 27 (Año 1)	2,72 a A	-9,54E-06 a A	670 a A		-0,0040 a A	0.97
SG H 27 (Año 2)	2,67 a A	-1,02E-05 a A	698 a A		-0,0041 a A	0.97

**Cuadro A1.3.**  
**(Continuación)**

d) Fotosíntesis Neta	Ordenada al origen $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Pendiente de la fase inicial $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{°Cdía}^{-1}$	Momento de cambio entre las fases TT (°Cdía) desde máxima expansión	Pendiente de la 2ª fase $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{°Cdía}^{-1}$	R <sup>2</sup>
FDD H 17 (Año 1)	37 a A	-7,02E-14 a A	462 a B	-0,1767 a A	0.94
FDD H 17 (Año 2)	37 a A	-7,64E-14 a A	482 a B	-0,1843 a A	0.96
FDD H 20 (Año 1)	37 a A	-4,98E-03 a A	458 a B	-0,1562 a A	0.97
FDD H 20 (Año 2)	37 a A	-5,23E-03 a A	478 a B	-0,1598 a A	0.97
FDD H 22 (Año 1)	36 a A	-3,68E-04 a A	512 a B	-0,2241 a A	0.96
FDD H 22 (Año 2)	37 a A	-3,78E-04 a A	530 a B	-0,2449 a A	0.98
FDD H 24 (Año 1)	36 a A	-2,66E-03 a A	507 a B	-0,5289 a B	0.99
FDD H 24 (Año 2)	37 a A	-2,87E-03 a A	538 a B	-0,5470 a B	0.99
FDD H 27 (Año 1)	36 a A	4,38E-04 a A	524 a B	-0,1337 a A	0.98
FDD H 27 (Año 2)	37 a A	4,82E-04 a A	556 a B	-0,1461 a A	0.99
SG H 17 (Año 1)	38 a A	-2,94E-03 a A	515 a A	-0,2502 a B	0.99
SG H 17 (Año 2)	37 a A	-3,23E-03 a A	536 a A	-0,2619 a B	0.98
SG H 20 (Año 1)	37 a A	1,33E-04 a A	676 a A	-0,2508 a B	0.99
SG H 20 (Año 2)	37 a A	1,34E-04 a A	711 a A	-0,2742 a B	0.99
SG H 22 (Año 1)	37 a A	-3,53E-05 a A	609 a A	-0,1907 a A	0.96
SG H 22 (Año 2)	37 a A	-3,67E-05 a A	647 a A	-0,2029 a A	0.92
SG H 24 (Año 1)	37 a A	-1,17E-03 a A	593 a A	-0,3457 a A	0.99
SG H 24 (Año 2)	37 a A	-1,28E-03 a A	613 a A	-0,3730 a A	0.96
SG H 27 (Año 1)	37 a A	-1,39E-03 a A	672 a A	-0,2235 a B	0.98
SG H 27 (Año 2)	37 a A	-1,51E-03 a A	714 a A	-0,2444 a B	0.96

**Cuadro A1.3.**  
**(Continuación)**

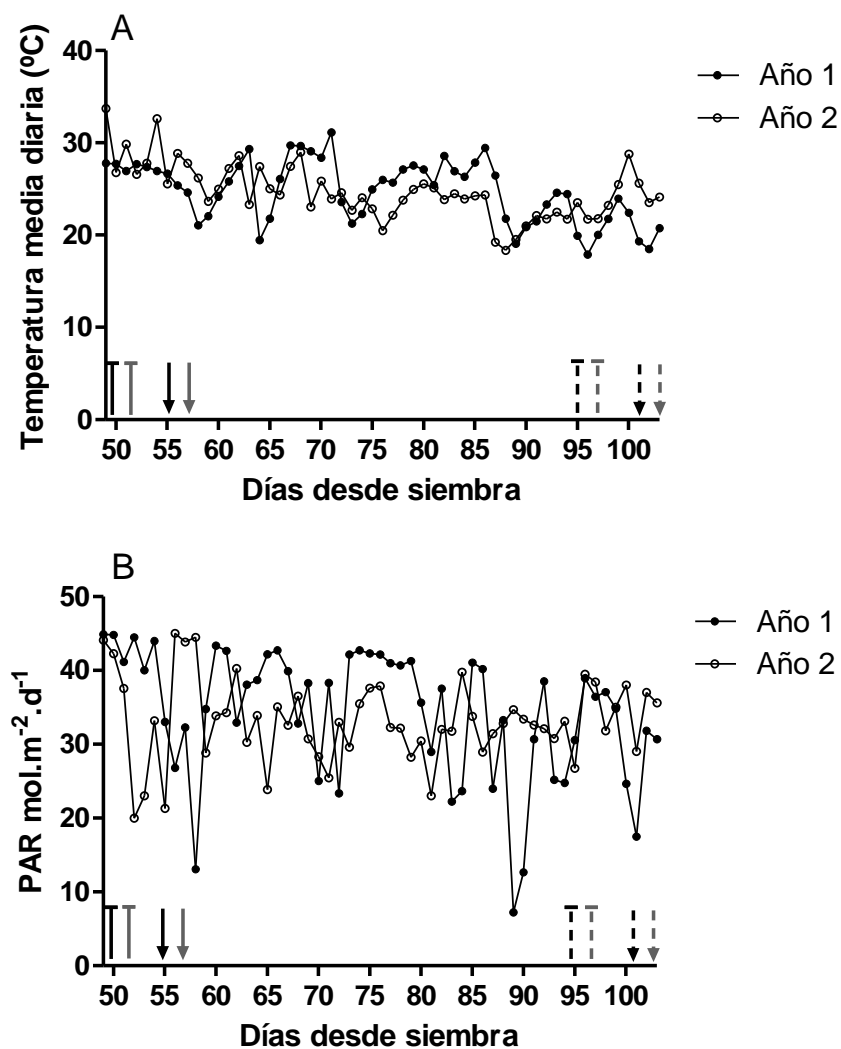
e) $F_v/F_m$	Momento de cambio							$R^2$
	Ordenada al origen $F_v F_m^{-1}$	Pendiente de la fase inicial $F_v F_m^{-1} \cdot ^\circ\text{C día}^{-1}$	entre las fases		Pendiente de la 2º fase $F_v F_m^{-1} \cdot ^\circ\text{C día}^{-1}$			
			TT ( $^\circ\text{C día}$ ) desde máxima expansión					
FDD H 17 (Año 1)	0,85 a A	-1,58E-11 a A	472 a B		-0,0010 a A	0.96		
FDD H 17 (Año 2)	0,85 a A	-1,69E-11 a A	490 a B		-0,0011 a A	0.98		
FDD H 20 (Año 1)	0,85 a A	-5,52E-05 a A	506 a B		-0,0012 a A	0.93		
FDD H 20 (Año 2)	0,85 a A	-5,74E-05 a A	518 a B		-0,0013 a A	0.94		
FDD H 22 (Año 1)	0,84 a A	-1,52E-05 a A	551 a B		-0,0026 a B	0.99		
FDD H 22 (Año 2)	0,85 a A	-1,61E-05 a A	570 a B		-0,0028 a B	0.97		
FDD H 24 (Año 1)	0,85 a A	-3,46E-05 a A	518 a B		-0,0044 a B	0.99		
FDD H 24 (Año 2)	0,85 a A	-3,50E-05 a A	550 a B		-0,0045 a B	0.96		
FDD H 27 (Año 1)	0,84 a A	1,25E-05 a A	551 a B		-0,0016 a A	0.92		
FDD H 27 (Año 2)	0,85 a A	1,33E-05 a A	574 a B		-0,0016 a A	0.96		
SG H 17 (Año 1)	0,85 a A	4,19E-12 a A	520 a A		-0,0011 a A	0.92		
SG H 17 (Año 2)	0,85 a A	4,61E-12 a A	542 a A		-0,0011 a A	0.95		
SG H 20 (Año 1)	0,85 a A	-4,41E-06 a A	702 a A		-0,0019 a A	0.97		
SG H 20 (Año 2)	0,85 a A	-4,79E-06 a A	739 a A		-0,0021 a A	0.93		
SG H 22 (Año 1)	0,85 a A	-7,37E-06 a A	633 a A		-0,0014 a A	0.96		
SG H 22 (Año 2)	0,85 a A	-7,81E-06 a A	672 a A		-0,0015 a A	0.90		
SG H 24 (Año 1)	0,84 a A	-8,97E-07 a A	612 a A		-0,0024 a A	0.99		
SG H 24 (Año 2)	0,85 a A	-9,67E-07 a A	633 a A		-0,0026 a A	0.96		
SG H 27 (Año 1)	0,85 a A	-1,68E-05 a A	675 a A		-0,0022 a A	0.99		
SG H 27 (Año 2)	0,85 a A	-1,80E-05 a A	703 a A		-0,0023 a A	0.96		

**Cuadro A1.3.**  
**(Continuación)**

f) trans-Zeatina	Momento de cambio											
	Ordenada		Pendiente de la		entre las fases		Pendiente de la 2º fase		R <sup>2</sup>			
	al origen		fase inicial		TT (°Cdía) desde		mg.g <sup>-1</sup> pesofresco.°Cdía <sup>-1</sup>					
	mg.g <sup>-1</sup> pesofresco		mg.g <sup>-1</sup> pesofresco.°Cdía <sup>-1</sup>		máxima expansión							
FDD H 17 (Año 1)	274	a B	1,70E-12	a A	451	a B	-3,4110	a A	0.98			
FDD H 17 (Año 2)	313	a B	1,78E-12	a A	466	a B	-3,5571	a A	0.98			
FDD H 20 (Año 1)	232	a B	-7,63E-12	a A	460	a B	-1,4590	a A	0.95			
FDD H 20 (Año 2)	227	a B	-7,93E-12	a A	470	a B	-1,4923	a A	0.96			
FDD H 22 (Año 1)	167	a B	2,81E-10	a A	499	a B	-0,4374	a A	0.91			
FDD H 22 (Año 2)	208	a B	3,08E-10	a A	509	a B	-0,4780	a A	0.95			
FDD H 24 (Año 1)	101	a B	-8,24E-12	a A	464	a B	-0,5862	a A	0.99			
FDD H 24 (Año 2)	125	a B	-8,56E-12	a A	493	a B	-0,6063	a A	0.97			
FDD H 27 (Año 1)	93	a B	8,67E-14	a A	491	a B	-0,2962	a A	0.96			
FDD H 27 (Año 2)	86	a B	9,42E-14	a A	517	a B	-0,3152	a A	0.98			
SG H 17 (Año 1)	642	a A	-2,08E-10	a A	522	a A	-5,9200	a B	0.96			
SG H 17 (Año 2)	603	a A	-2,27E-10	a A	544	a A	-6,1961	a B	0.94			
SG H 20 (Año 1)	705	a A	-8,46E-10	a A	653	a A	-4,9330	a B	0.92			
SG H 20 (Año 2)	664	a A	-8,96E-10	a A	687	a A	-5,3940	a B	0.97			
SG H 22 (Año 1)	694	a A	1,04E-06	a A	577	a A	-3,3810	a B	0.92			
SG H 22 (Año 2)	692	a A	1,09E-06	a A	672	a A	-3,5980	a B	0.89			
SG H 24 (Año 1)	806	a A	-4,93E-09	a A	547	a A	-5,1860	a B	0.96			
SG H 24 (Año 2)	833	a A	-5,41E-09	a A	566	a A	-5,5954	a B	0.98			
SG H 27 (Año 1)	869	a A	6,58E-10	a A	660	a A	-4,8570	a B	0.98			
SG H 27 (Año 2)	844	a A	6,90E-10	a A	688	a A	-5,0236	a B	0.96			

**Cuadro A1.4.** Valores p resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efecto de los factores híbrido (H), estadio fenológico de medición (S), posición de la hoja (P), año (A) y sus interacciones sobre la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y la relación rojo/rojo lejano. Las interacciones H x S, H x A, S x A, P x A, H x S x P, H x S x A, H x P x A, S x P x A, H x S x P x A no se muestran debido a que no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) en ningún caso (ns: no significativo,  $p > 0.05$ ).

	<i>Valor-p</i>					
	H	S	P	A	H x P	S x P
Radiación PAR	<0.0001	ns	<0.0001	ns	<0.0001	ns
Relación rojo/rojo lejano	<0.0001	ns	<0.0001	ns	<0.0001	ns



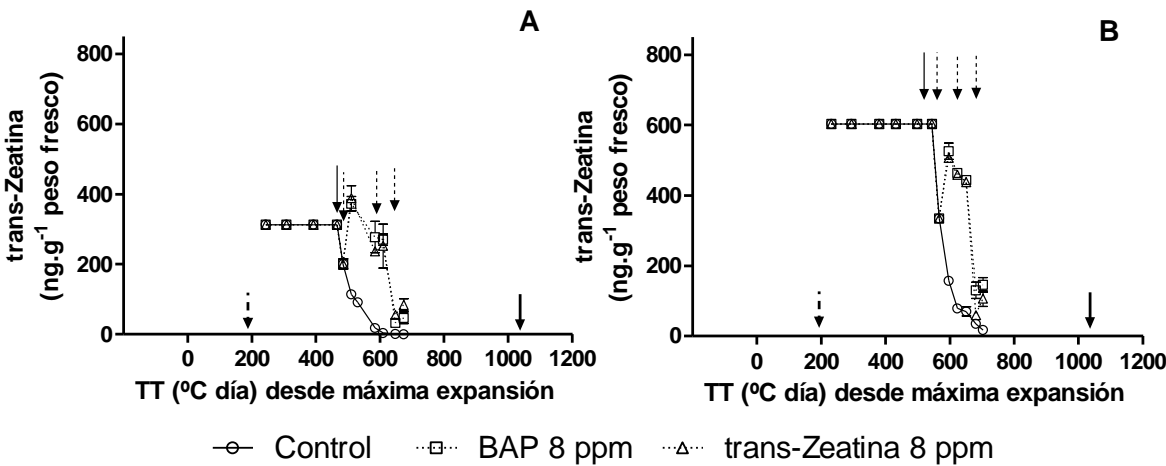
**Fig. A.1.1.** Dinámica de la temperatura media diaria (A) y de la radiación fotosintéticamente activa (PAR, B), en función de los días desde la siembra para los años 1 y 2 de experimentación. Las flechas (Año 1) y las líneas (Año 2) próximas al eje “x” indican los momentos de R5.1 (continuas) y de R9 (discontinuas), para los híbridos fast dry down (negras) y stay green (grises).



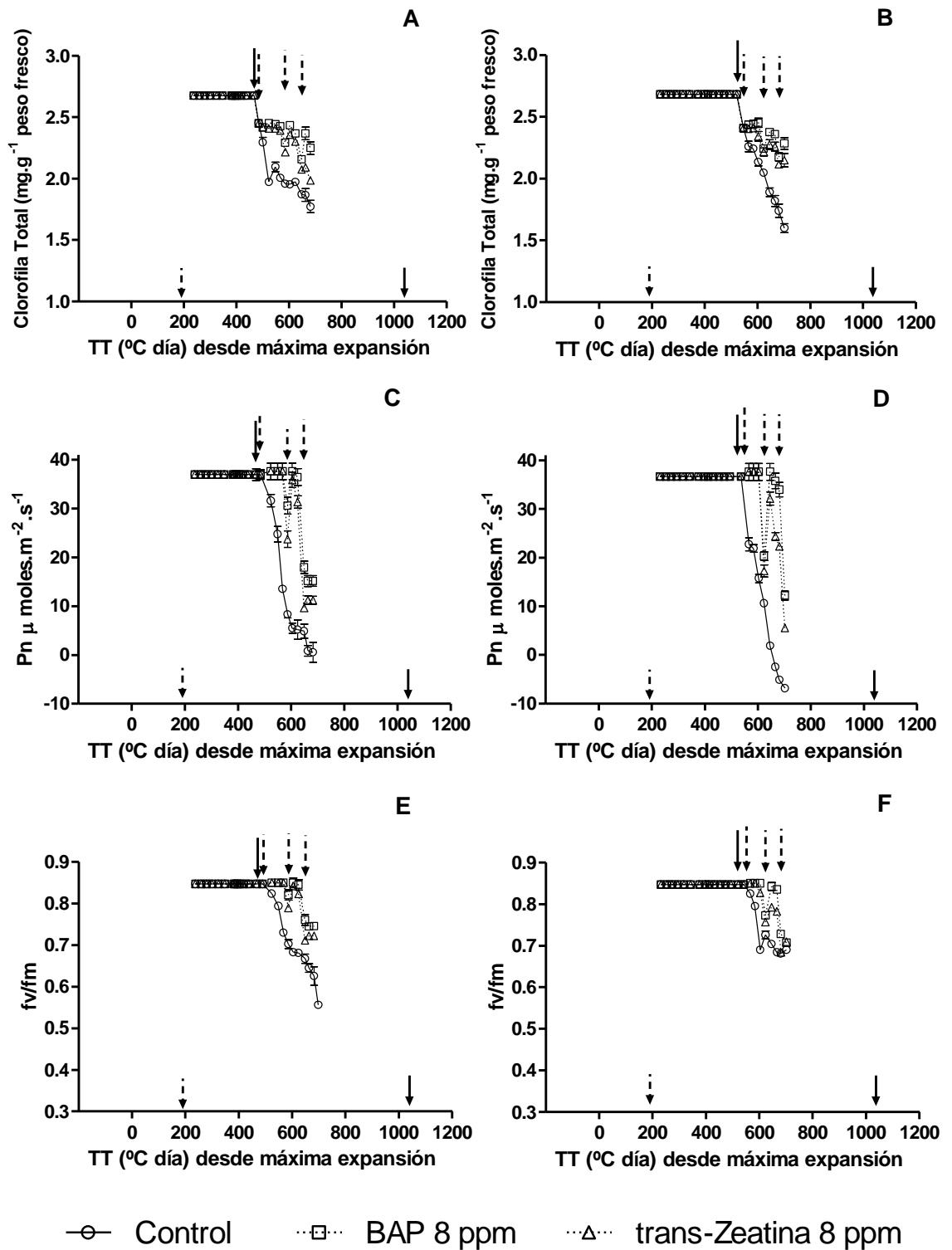
Apéndice II

**Cuadro A2.1.** Valores p resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efectos de los factores híbrido (H), estadío fenológico de medición (S), año (A) y sus interacciones sobre la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogidas en el período de observación. Las interacciones H x A, S x A, H x S x A no se muestran debido a que no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) en ningún caso (ns: no significativo,  $p > 0.05$ ).

	Valor-p			
	H	S	A	H x S
Citocininas totales (ng.minuto <sup>-1</sup> )	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001



**Fig. A.2.1.** Dinámica de la concentración de trans-Zeatina en la hoja 17 en función del tiempo térmico (Tb 4°C) desde la máxima expansión de la hoja, y en respuesta a aplicaciones exógenas de 8 ppm de soluciones de BAP y de trans-Zeatina en los híbridos fast dry down (A) y stay green (B). La flecha continua cercana a la curva indica el momento de inicio de la caída de la concentración de clorofila total del tratamiento control. Las flechas discontinuas cercanas a la curva indican los momentos de aplicación. Las flechas pequeñas cercanas al eje "x" indican el momento de ocurrencia del estadío R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. ( $n = 5$ ). Datos correspondientes al Año 2.



**Fig. A.2.2.** Dinámica de la concentración de clorofila total (A, B), de la fotosíntesis neta (Pn) (C, D) y del rendimiento cuántico máximo de PSII ( $F_v/F_m$ ) (E, F) en la hoja 17, en función del tiempo térmico (Tb 4°C) desde la máxima expansión de la hoja, y en respuesta a aplicaciones exógenas de BAP y de trans-Zeatina, en los híbridos fast dry down (A, C, E) y stay green (B, D, F). La flecha continua cercana a la curva indica el momento de inicio de la caída de la concentración de clorofila total del tratamiento control. Las flechas discontinuas cercanas a la curva indican los momentos de aplicación. Las flechas pequeñas cercanas al eje "x" indican el momento de ocurrencia del estadio R5.1 (discontinua) y R9 (continua). Las barras verticales en cada símbolo indican  $\pm 1$  E. S. (n = 5). Datos correspondientes al Año 2.

## Apéndice III

**Cuadro A3.1.** Valores p resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efecto de los factores híbrido (H), tratamiento desgranado (T) y año (A) y sus interacciones sobre los parámetros (ordenada al origen, pendiente de la fase inicial, momento de cambio entre las fases y pendiente de la segunda fase) de las funciones bi-lineales ajustadas a la dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) y el índice de área foliar verde (IAFV) (n = 5). Las interacciones H x A, T x A, H x T x A no se muestran debido a que no fueron significativas (p > 0.05) en ningún caso (ns: no significativo, p > 0.05).

		Valor-p			
		H	T	A	H x T
DLRV	Ordenada al origen	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001
	Pendiente de la fase inicial	ns	0.0037	ns	ns
	Momento de cambio entre las fases	0.0010	<0.0001	ns	0.0145
	Pendiente de la segunda fase	ns	ns	ns	ns
IAFV	Ordenada al origen	<0.0001	ns	ns	ns
	Pendiente de la fase inicial	ns	ns	ns	ns
	Momento de cambio entre las fases	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001
	Pendiente de la segunda fase	ns	ns	ns	ns

**Cuadro A3.2.** Valores p resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efecto de los factores híbrido (H), tratamiento desgranado (T), estadio fenológico de medición (S), año (A) y sus interacciones sobre la cantidad de citocininas totales en el fluido xilemático recogidas en el período de observación. Las interacciones H x A, T x A, S x A, H x T x A, H x S x A, T x S x A, H x T x S x A no se muestran debido a que no fueron significativas (p > 0.05) en ningún caso (ns: no significativo, p > 0.05).

		Valor-p						
		H	T	S	A	H x T	H x S	T x S
Citocininas totales ng.minuto <sup>-1</sup>		<0.0001	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001

**Cuadro A3.3.** Valores p resultantes del ANOVA realizado para evaluar el efecto de los factores híbrido (H), tratamiento desgranado (T), posición de la hoja (P), año (A) y sus interacciones sobre los parámetros (ordenada al origen, pendiente de la fase inicial, momento de cambio entre las fases y pendiente de la segunda fase) de las funciones bi-lineales ajustadas a la dinámica de la clorofila total, la fotosíntesis neta, rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) y la trans-Zeatina (n=5). Las interacciones H x A, T x A, P x A, H x T x A, H x P x A, T x P x A, H x T x P x A no se muestran debido a que no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) en ningún caso (ns: no significativo,  $p > 0.05$ ).

		Valor-p							
		H	T	P	A	H x T	H x P	T x P	H x T x P
Clorofila Total	Ordenada al origen	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Pendiente de la fase inicial	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Momento de cambio entre las fases	<0.0001	<0.0001	<0.0001	ns	0.0139	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	Pendiente de la segunda fase	0.0001	0.0096	<0.0001	ns	0.0139	0.0009	<0.0001	0.0220
Fotosíntesis Neta	Ordenada al origen	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Pendiente de la fase inicial	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Momento de cambio entre las fases	<0.0001	<0.0001	<0.0001	ns	ns	0.0084	<0.0001	0.0070
	Pendiente de la segunda fase	0.0021	0.0018	<0.0001	ns	0.0073	0.0309	<0.0001	0.0058
$F_v/F_m$	Ordenada al origen	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Pendiente de la fase inicial	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Momento de cambio entre las fases	<0.0001	<0.0001	<0.0001	ns	ns	0.0003	<0.0001	<0.0001
	Pendiente de la segunda fase	ns	0.0002	<0.0001	ns	ns	<0.0001	<0.0001	0.0097
trans-Zeatina	Ordenada al origen	<0.0001	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	Pendiente de la fase inicial	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Momento de cambio entre las fases	<0.0001	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	Pendiente de la segunda fase	<0.0001	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

**Cuadro A3.4.** Contraste entre años para las funciones ajustadas a la dinámica de la densidad longitudinal de raíces vivas (DLRV) (a), del índice de área foliar verde (IAFV) (b), y de los indicadores de funcionalidad foliar: concentración de clorofila total (c), fotosíntesis neta (d), rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) (e) y concentración de trans-Zeatina (f), para las posiciones foliares 17, 20, 22, 24 y 27, los tratamientos control (C) y desgranado (-F), en un híbrido fast dry down (FDD) y otro stay green (SG). Se muestran los valores de los cuatro parámetros de las funciones bi-lineales (ordenada al origen, pendiente de la fase inicial, momento de cambio entre las fases y la pendiente de la segunda fase), ajustadas a cada relación variable/momento en los dos años ( $n = 5$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre años, y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos C y -F para cada combinación híbrido por posición de la hoja. Las mediciones se tomaron desde el principio de antesis, hasta algunos días después de la madurez fisiológica. DDIA significa "días desde el inicio de antesis", y "TT ( $^{\circ}\text{C día}$ ,  $T_b=4^{\circ}\text{C}$ )" Tiempo térmico desde que la máxima expansión de las hojas fue alcanzada en cada posición.

a) DLRV	Ordenada al origen $\text{cm.cm}^{-3}$	Pendiente de la fase inicial $\text{cm.cm}^{-3}.\text{día}^{-1}$	Momento de cambio entre las fases (DDIA)	Pendiente de la 2 <sup>o</sup> fase $\text{cm.cm}^{-3}.\text{día}^{-1}$	R <sup>2</sup>
FDD C (Año 1)	0,34 a B	4,46E-03 a B	5 a B	-0,0740 a A	0.91
FDD C (Año 2)	0,32 a B	3,95E-03 a B	7 a B	-0,0550 a A	0.86
FDD -F (Año 1)	0,40 a A	1,73E-02 a A	19 a A	-0,0760 a A	0.96
FDD -F (Año 2)	0,39 a A	2,58E-02 a A	19 a A	-0,0690 a A	0.99
SG C (Año 1)	0,42 a B	4,69E-03 a B	12 a B	-0,0730 a A	0.92
SG C (Año 2)	0,39 a B	4,21E-03 a B	10 a B	-0,0660 a A	0.88
SG -F (Año 1)	0,47 a A	1,88E-02 a A	24 a A	-0,0774 a A	0.96
SG -F (Año 2)	0,46 a A	1,98E-02 a A	25 a A	-0,0640 a A	0.97

b) IAFV	Ordenada al origen IAFV	Pendiente de la fase inicial IAFV. $\text{día}^{-1}$	Momento de cambio entre las fases (DDIA)	Pendiente de la 2 <sup>o</sup> fase IAFV. $\text{día}^{-1}$	R <sup>2</sup>
FDD C (Año 1)	5,35 a A	-4,41E-12 a A	12 a B	-0,1095 a A	0.98
FDD C (Año 2)	5,28 a A	-4,45E-11 a A	16 a B	-0,1059 a A	0.97
FDD -F (Año 1)	5,54 a A	-3,52E-13 a A	39 a A	-0,1170 a A	0.98
FDD -F (Año 2)	5,45 a A	-9,37E-12 a A	41 a A	-0,1140 a A	0.99
SG C (Año 1)	5,89 a A	4,19E-11 a A	18 a B	-0,0935 a A	0.99
SG C (Año 2)	5,72 a A	6,02E-11 a A	22 a B	-0,0988 a A	0.99
SG -F (Año 1)	6,02 a A	-1,19E-13 a A	44 a A	-0,1071 a A	0.99
SG -F (Año 2)	5,96 a A	-5,65E-13 a A	46 a A	-0,0999 a A	0.99

**Cuadro A3.4.**  
**(Continuación)**

c)	Clorofila Total	Ordenada al origen  mg.g <sup>-1</sup> pesofresco			Pendiente de la fase inicial  mg.g <sup>-1</sup> .pesofresco.°Cdía <sup>-1</sup>	Momento de cambio				Pendiente de la 2º fase mg.g <sup>-1</sup> .pesofresco.°Cdía <sup>-1</sup>		R <sup>2</sup>		
						entre las fases TT (°Cdía) desde		máxima expansión						
FDD C H 17 (Año 1)		2,67	a	A	1,24E-12	a	A	449	a	B	-0,0038	a	A	0.94
FDD C H 17 (Año 2)		2,67	a	A	1,35E-12	a	A	468	a	B	-0,0039	a	A	0.95
FDD -F H 17 (Año 1)		2,67	a	A	-1,31E-11	a	A	1062	a	A	-0,0030	a	A	0.98
FDD -F H 17 (Año 2)		2,65	a	A	-1,41E-11	a	A	1085	a	A	-0,0031	a	A	0.95
FDD C H 20 (Año 1)		2,69	a	A	-1,61E-04	a	A	465	a	B	-0,0032	a	A	0.97
FDD C H 20 (Año 2)		2,65	a	A	-1,74E-04	a	A	475	a	B	-0,0033	a	A	0.93
FDD -F H 20 (Año 1)		2,70	a	A	5,66E-05	a	A	1029	a	A	-0,0035	a	A	0.97
FDD -F H 20 (Año 2)		2,67	a	A	6,17E-05	a	A	1062	a	A	-0,0037	a	A	0.94
FDD C H 22 (Año 1)		2,66	a	A	-2,24E-05	a	A	508	a	B	-0,0058	a	B	0.99
FDD C H 22 (Año 2)		2,68	a	A	-2,39E-05	a	A	525	a	B	-0,0063	a	B	0.98
FDD -F H 22 (Año 1)		2,68	a	A	4,52E-05	a	A	1099	a	A	-0,0038	a	A	0.98
FDD -F H 22 (Año 2)		2,67	a	A	4,66E-05	a	A	1117	a	A	-0,0040	a	A	0.94
FDD C H 24 (Año 1)		2,67	a	A	-4,62E-05	a	A	464	a	B	-0,0086	a	B	0.99
FDD C H 24 (Año 2)		2,66	a	A	-4,76E-05	a	A	493	a	B	-0,0089	a	B	0.98
FDD -F H 24 (Año 1)		2,69	a	A	-8,67E-06	a	A	1005	a	A	-0,0060	a	A	0.99
FDD -F H 24 (Año 2)		2,61	a	A	-9,27E-06	a	A	1037	a	A	-0,0066	a	A	0.97
FDD C H 27 (Año 1)		2,69	a	A	5,96E-11	a	A	507	a	B	-0,0041	a	A	0.98
FDD C H 27 (Año 2)		2,72	a	A	6,43E-11	a	A	528	a	B	-0,0043	a	A	0.98
FDD -F H 27 (Año 1)		2,63	a	A	1,78E-04	a	A	1030	a	A	-0,0048	a	A	0.91
FDD -F H 27 (Año 2)		2,75	a	A	1,83E-04	a	A	1047	a	A	-0,0049	a	A	0.94
SG C H 17 (Año 1)		2,68	a	A	-1,74E-13	a	A	500	a	B	-0,0055	a	A	0.99
SG C H 17 (Año 2)		2,68	a	A	-1,91E-13	a	A	521	a	B	-0,0058	a	A	0.96
SG -F H 17 (Año 1)		2,69	a	A	-9,32E-06	a	A	1091	a	A	-0,0056	a	A	0.98
SG -F H 17 (Año 2)		2,68	a	A	-1,01E-05	a	A	1113	a	A	-0,0061	a	A	0.95
SG C H 20 (Año 1)		2,66	a	A	-6,19E-06	a	A	660	a	B	-0,0054	a	A	0.99
SG C H 20 (Año 2)		2,67	a	A	-6,68E-06	a	A	694	a	B	-0,0059	a	A	0.95

**Cuadro A3.4.**  
**(Continuación)**

SG -F H 20 (Año 1)	2,75	a	A	-2,68E-05	a	A	1131	a	A	-0,0082	a	B	0.98
SG -F H 20 (Año 2)	2,68	a	A	-2,95E-05	a	A	1147	a	A	-0,0085	a	B	0.99
SG C H 22 (Año 1)	2,70	a	A	1,02E-04	a	A	561	a	B	-0,0041	a	A	0.97
SG C H 22 (Año 2)	2,72	a	A	1,05E-04	a	A	596	a	B	-0,0044	a	A	0.99
SG -F H 22 (Año 1)	2,72	a	A	1,06E-11	a	A	1056	a	A	-0,0069	a	B	0.97
SG -F H 22 (Año 2)	2,69	a	A	1,07E-11	a	A	1070	a	A	-0,0074	a	B	0.96
SG C H 24 (Año 1)	2,72	a	A	5,62E-08	a	A	567	a	B	-0,0075	a	A	0.99
SG C H 24 (Año 2)	2,73	a	A	5,68E-08	a	A	586	a	B	-0,0081	a	A	0.97
SG -F H 24 (Año 1)	2,70	a	A	-2,17E-05	a	A	1065	a	A	-0,0091	a	A	0.87
SG -F H 24 (Año 2)	2,63	a	A	-2,24E-05	a	A	1088	a	A	-0,0096	a	A	0.94
SG C H 27 (Año 1)	2,72	a	A	-9,54E-06	a	A	670	a	B	-0,0040	a	A	0.97
SG C H 27 (Año 2)	2,67	a	A	-1,02E-05	a	A	698	a	B	-0,0041	a	A	0.97
SG -F H 27 (Año 1)	2,72	a	A	1,05E-04	a	A	1032	a	A	-0,0038	a	A	0.94
SG -F H 27 (Año 2)	2,64	a	A	1,06E-04	a	A	1046	a	A	-0,0041	a	A	0.96

**Cuadro A3.4.**  
**(Continuación)**

d) Fotosíntesis Neta	Ordenada al origen		Pendiente de la fase inicial		Momento de cambio entre las fases TT (°Cdía) desde máxima expansión		Pendiente de la 2º fase $\mu\text{moles.m}^{-2}\text{s}^{-1}.\text{°Cdía}^{-1}$		$R^2$
	$\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$		$\mu\text{moles.m}^{-2}\text{s}^{-1}.\text{°Cdía}^{-1}$						
FDD C H 17 (Año 1)	37	a A	-7,02E-14	a A	462	a B	-0,1767	a A	0.94
FDD C H 17 (Año 2)	37	a A	-7,64E-14	a A	482	a B	-0,1843	a A	0.96
FDD -F H 17 (Año 1)	38	a A	-1,50E-03	a A	1072	a A	-0,1605	a A	0.98
FDD -F H 17 (Año 2)	37	a A	-1,54E-03	a A	1095	a A	-0,1754	a A	0.97
FDD C H 20 (Año 1)	37	a A	-4,98E-03	a A	458	a B	-0,1562	a A	0.97
FDD C H 20 (Año 2)	37	a A	-5,23E-03	a A	478	a B	-0,1598	a A	0.97
FDD -F H 20 (Año 1)	37	a A	-4,67E-04	a A	1033	a A	-0,1370	a A	0.98
FDD -F H 20 (Año 2)	36	a A	-5,04E-04	a A	1044	a A	-0,1417	a A	0.93
FDD C H 22 (Año 1)	36	a A	-3,68E-04	a A	512	a B	-0,2241	a A	0.96
FDD C H 22 (Año 2)	37	a A	-3,78E-04	a A	530	a B	-0,2449	a A	0.98
FDD -F H 22 (Año 1)	37	a A	1,90E-04	a A	1104	a A	-0,2206	a A	0.99
FDD -F H 22 (Año 2)	37	a A	2,07E-04	a A	1131	a A	-0,2301	a A	0.98
FDD C H 24 (Año 1)	36	a A	-2,66E-03	a A	507	a B	-0,5289	a B	0.99
FDD C H 24 (Año 2)	37	a A	-2,87E-03	a A	538	a B	-0,5470	a B	0.99
FDD -F H 24 (Año 1)	36	a A	-1,88E-04	a A	1021	a A	-0,2045	a A	0.99
FDD -F H 24 (Año 2)	37	a A	-1,97E-04	a A	1044	a A	-0,2092	a A	0.97
FDD C H 27 (Año 1)	36	a A	4,38E-04	a A	524	a B	-0,1337	a A	0.98
FDD C H 27 (Año 2)	37	a A	4,82E-04	a A	556	a B	-0,1461	a A	0.99
FDD -F H 27 (Año 1)	37	a A	-2,58E-04	a A	1039	a A	-0,3068	a B	0.98
FDD -F H 27 (Año 2)	37	a A	-2,78E-04	a A	1050	a A	-0,3173	a B	0.94
SG C H 17 (Año 1)	38	a A	-2,94E-03	a A	515	a B	-0,2502	a B	0.99
SG C H 17 (Año 2)	37	a A	-3,23E-03	a A	536	a B	-0,2619	a B	0.98
SG -F H 17 (Año 1)	37	a A	-1,52E-03	a A	1108	a A	-0,1618	a A	0.95
SG -F H 17 (Año 2)	37	a A	-1,58E-03	a A	1142	a A	-0,1722	a A	0.98
SG C H 20 (Año 1)	37	a A	1,33E-04	a A	676	a B	-0,2508	a A	0.99
SG C H 20 (Año 2)	37	a A	1,34E-04	a A	711	a B	-0,2742	a A	0.99



**Cuadro A3.4.**  
**(Continuación)**

SG -F H 20 (Año 1)	37	a	A	-1,32E-03	a	A	1147	a	A	-0,4029	a	B	0.98
SG -F H 20 (Año 2)	38	a	A	-1,44E-03	a	A	1182	a	A	-0,4347	a	B	0.99
SG C H 22 (Año 1)	37	a	A	-3,53E-05	a	A	609	a	B	-0,1907	a	A	0.96
SG C H 22 (Año 2)	37	a	A	-3,67E-05	a	A	647	a	B	-0,2029	a	A	0.92
SG -F H 22 (Año 1)	37	a	A	-1,53E-03	a	A	1102	a	A	-0,4068	a	B	0.98
SG -F H 22 (Año 2)	37	a	A	-1,68E-03	a	A	1129	a	A	-0,4258	a	B	0.94
SG C H 24 (Año 1)	37	a	A	-1,17E-03	a	A	593	a	B	-0,3457	a	A	0.99
SG C H 24 (Año 2)	37	a	A	-1,28E-03	a	A	613	a	B	-0,373	a	A	0.96
SG -F H 24 (Año 1)	38	a	A	-2,64E-03	a	A	1089	a	A	-0,5361	a	B	0.96
SG -F H 24 (Año 2)	37	a	A	-2,68E-03	a	A	1103	a	A	-0,5594	a	B	0.99
SG C H 27 (Año 1)	37	a	A	-1,39E-03	a	A	672	a	B	-0,2235	a	A	0.98
SG C H 27 (Año 2)	37	a	A	-1,51E-03	a	A	714	a	B	-0,2444	a	A	0.96
SG -F H 27 (Año 1)	37	a	A	-1,78E-03	a	A	1058	a	A	-0,1646	a	A	0.95
SG -F H 27 (Año 2)	37	a	A	-1,93E-03	a	A	1090	a	A	-0,1776	a	A	0.99

**Cuadro A3.4.**  
**(Continuación)**

e) $F_v/F_m$	Ordenada al origen $F_v F_m^{-1}$	Pendiente de la fase inicial $F_v F_m^{-1} \cdot ^\circ\text{Cdía}^{-1}$	Momento de cambio entre las fases TT ( $^\circ\text{Cdía}$ ) desde máxima expansión			Pendiente de la 2ª fase $F_v F_m^{-1} \cdot ^\circ\text{Cdía}^{-1}$	$R^2$
FDD C H 17 (Año 1)	0,85 a A	-1,58E-11 a A	472 a B			-0,0010 a A	0.96
FDD C H 17 (Año 2)	0,85 a A	-1,69E-11 a A	490 a B			-0,0011 a A	0.98
FDD -F H 17 (Año 1)	0,85 a A	-7,05E-06 a A	1086 a A			-0,0010 a A	0.97
FDD -F H 17 (Año 2)	0,85 a A	-7,13E-06 a A	1110 a A			-0,0010 a A	0.99
FDD C H 20 (Año 1)	0,85 a A	-5,52E-05 a A	506 a B			-0,0012 a A	0.93
FDD C H 20 (Año 2)	0,85 a A	-5,74E-05 a A	518 a B			-0,0013 a A	0.94
FDD -F H 20 (Año 1)	0,85 a A	-6,76E-06 a A	1066 a A			-0,0014 a A	0.91
FDD -F H 20 (Año 2)	0,85 a A	-7,16E-06 a A	1091 a A			-0,0015 a A	0.98
FDD C H 22 (Año 1)	0,84 a A	-1,52E-05 a A	551 a B			-0,0026 a B	0.99
FDD C H 22 (Año 2)	0,85 a A	-1,61E-05 a A	570 a B			-0,0028 a B	0.97
FDD -F H 22 (Año 1)	0,85 a A	-4,79E-06 a A	1134 a A			-0,0017 a A	0.97
FDD -F H 22 (Año 2)	0,85 a A	-4,98E-06 a A	1159 a A			-0,0018 a A	0.99
FDD C H 24 (Año 1)	0,85 a A	-3,46E-05 a A	518 a B			-0,0044 a B	0.99
FDD C H 24 (Año 2)	0,85 a A	-3,50E-05 a A	550 a B			-0,0045 a B	0.96
FDD -F H 24 (Año 1)	0,85 a A	-7,47E-06 a A	1044 a A			-0,0026 a A	0.97
FDD -F H 24 (Año 2)	0,85 a A	-7,99E-06 a A	1069 a A			-0,0027 a A	0.98
FDD C H 27 (Año 1)	0,84 a A	1,25E-05 a A	551 a B			-0,0016 a A	0.92
FDD C H 27 (Año 2)	0,85 a A	1,33E-05 a A	574 a B			-0,0016 a A	0.96
FDD -F H 27 (Año 1)	0,85 a A	-2,39E-05 a A	1076 a A			-0,0031 a A	0.95
FDD -F H 27 (Año 2)	0,85 a A	-2,42E-05 a A	1100 a A			-0,0032 a A	0.99
SG C H 17 (Año 1)	0,85 a A	4,19E-12 a A	520 a B			-0,0011 a A	0.92
SG C H 17 (Año 2)	0,85 a A	4,61E-12 a A	542 a B			-0,0011 a A	0.95
SG -F H 17 (Año 1)	0,85 a A	-4,83E-06 a A	1134 a A			-0,0012 a A	0.99
SG -F H 17 (Año 2)	0,85 a A	-5,21E-06 a A	1149 a A			-0,0013 a A	0.99
SG C H 20 (Año 1)	0,85 a A	-4,41E-06 a A	702 a B			-0,0019 a A	0.97
SG C H 20 (Año 2)	0,85 a A	-4,79E-06 a A	739 a B			-0,0021 a A	0.93

**Cuadro A3.4.**  
**(Continuación)**

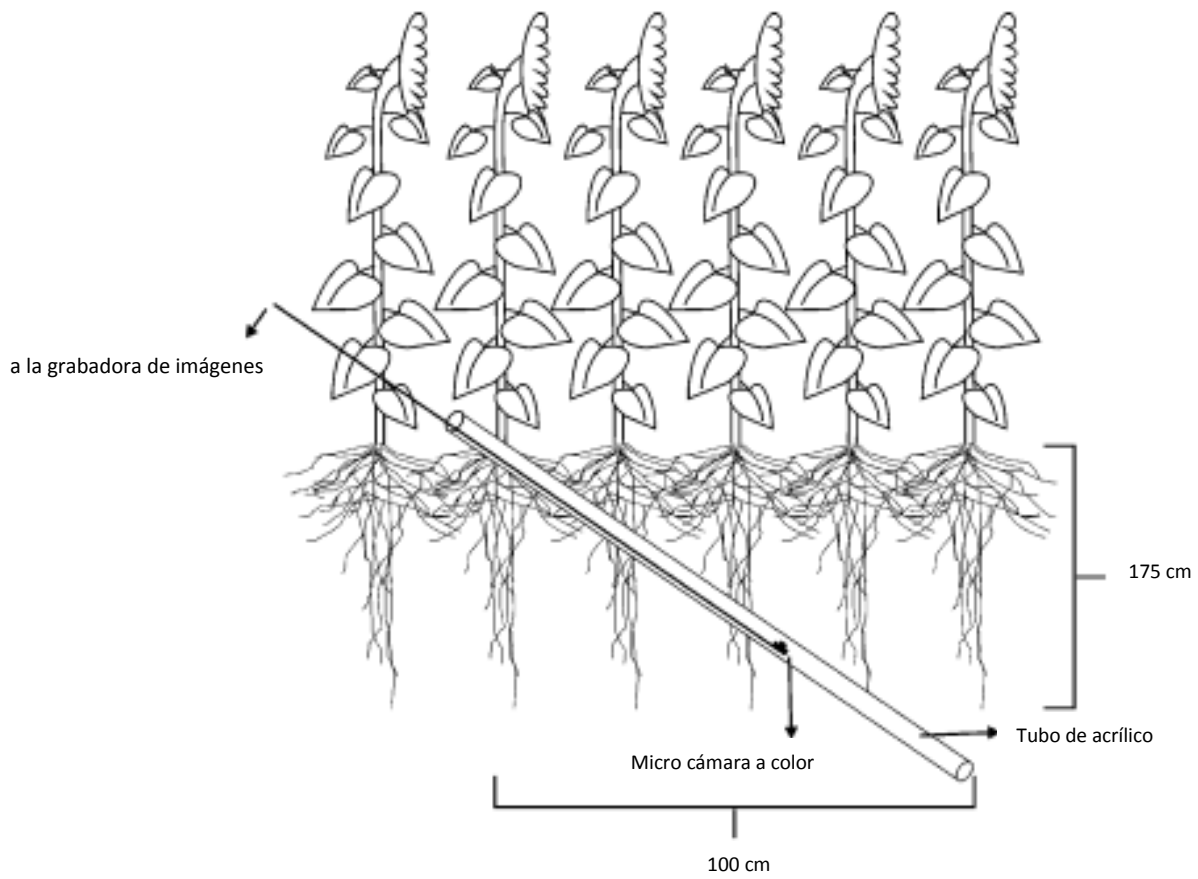
SG -F H 20 (Año 1)	0,85	a	A	-8,94E-06	a	A	1167	a	A	-0,0034	a	B	0.98
SG -F H 20 (Año 2)	0,85	a	A	-9,47E-06	a	A	1174	a	A	-0,0036	a	B	0.97
SG C H 22 (Año 1)	0,85	a	A	-7,37E-06	a	A	633	a	B	-0,0014	a	A	0.96
SG C H 22 (Año 2)	0,85	a	A	-7,81E-06	a	A	672	a	B	-0,0015	a	A	0.90
SG -F H 22 (Año 1)	0,85	a	A	-2,43E-05	a	A	1115	a	A	-0,0041	a	B	0.95
SG -F H 22 (Año 2)	0,85	a	A	-2,64E-05	a	A	1143	a	A	-0,0045	a	B	0.92
SG C H 24 (Año 1)	0,84	a	A	-8,97E-07	a	A	612	a	B	-0,0024	a	A	0.99
SG C H 24 (Año 2)	0,85	a	A	-9,67E-07	a	A	633	a	B	-0,0026	a	A	0.96
SG -F H 24 (Año 1)	0,84	a	A	-1,11E-05	a	A	1098	a	A	-0,0036	a	B	0.98
SG -F H 24 (Año 2)	0,85	a	A	-1,22E-05	a	A	1114	a	A	-0,0038	a	B	0.99
SG C H 27 (Año 1)	0,85	a	A	-1,68E-05	a	A	675	a	B	-0,0022	a	A	0.99
SG C H 27 (Año 2)	0,85	a	A	-1,80E-05	a	A	703	a	B	-0,0023	a	A	0.96
SG -F H 27 (Año 1)	0,85	a	A	-1,59E-05	a	A	1078	a	A	-0,0026	a	A	0.97
SG -F H 27 (Año 2)	0,85	a	A	-1,72E-05	a	A	1092	a	A	-0,0029	a	A	0.99

**Cuadro A3.4.**  
**(Continuación)**

f) trans-Zeatina	Momento de cambio											
	Ordenada al origen		Pendiente de la fase inicial		entre las fases			Pendiente de la 2º fase			R <sup>2</sup>	
					TT (°Cdía) desde	máxima expansión		mg.g <sup>-1</sup> pesofresco.°Cdía <sup>-1</sup>				
	mg.g <sup>-1</sup>	pesofresco	mg.g <sup>-1</sup>	pesofresco.°Cdía <sup>-1</sup>								
FDD C H 17 (Año 1)	274	a B	1,70E-12	a A	451	a B	-3,4110	a A	0.98			
FDD C H 17 (Año 2)	313	a B	1,78E-12	a A	466	a B	-3,5571	a A	0.98			
FDD -F H 17 (Año 1)	670	a A	-4,63E-10	a A	922	a A	-2,6710	a A	0.99			
FDD -F H 17 (Año 2)	666	a A	-4,81E-10	a A	942	a A	-2,7320	a A	0.99			
FDD C H 20 (Año 1)	232	a B	-7,63E-12	a A	460	a B	-1,4590	a A	0.95			
FDD C H 20 (Año 2)	227	a B	-7,93E-12	a A	470	a B	-1,4923	a A	0.96			
FDD -F H 20 (Año 1)	811	a A	-4,94E-11	a A	862	a A	-3,4580	a B	0.98			
FDD -F H 20 (Año 2)	802	a A	-5,18E-11	a A	874	a A	-3,6062	a B	0.96			
FDD C H 22 (Año 1)	167	a B	2,81E-10	a A	499	a B	-0,4374	a A	0.91			
FDD C H 22 (Año 2)	208	a B	3,08E-10	a A	509	a B	-0,4780	a A	0.95			
FDD -F H 22 (Año 1)	776	a A	1,47E-10	a A	905	a A	-3,2490	a B	0.98			
FDD -F H 22 (Año 2)	754	a A	1,53E-10	a A	914	a A	-3,3604	a B	0.93			
FDD C H 24 (Año 1)	101	a B	-8,24E-12	a A	464	a B	-0,5862	a A	0.99			
FDD C H 24 (Año 2)	125	a B	-8,56E-12	a A	493	a B	-0,6063	a A	0.97			
FDD -F H 24 (Año 1)	931	a A	3,19E-10	a A	852	a A	-5,5340	a B	0.99			
FDD -F H 24 (Año 2)	915	a A	3,51E-10	a A	881	a A	-6,0478	a B	0.98			
FDD C H 27 (Año 1)	93	a B	8,67E-14	a A	491	a B	-0,2962	a B	0.96			
FDD C H 27 (Año 2)	86	a B	9,42E-14	a A	517	a B	-0,3152	a B	0.98			
FDD -F H 27 (Año 1)	910	a A	8,40E-10	a A	901	a A	-6,4200	a A	0.95			
FDD -F H 27 (Año 2)	895	a A	9,23E-10	a A	932	a A	-7,0161	a A	0.96			
SG C H 17 (Año 1)	642	a B	-2,08E-10	a A	522	a B	-5,9200	a A	0.96			
SG C H 17 (Año 2)	603	a B	-2,27E-10	a A	544	a B	-6,1961	a A	0.94			
SG -F H 17 (Año 1)	952	a A	-2,42E-12	a A	1007	a A	-4,2900	a A	0.99			
SG -F H 17 (Año 2)	934	a A	-2,56E-12	a A	1059	a A	-4,6909	a A	0.97			
SG C H 20 (Año 1)	705	a B	-8,46E-10	a A	653	a B	-4,933	a A	0.92			
SG C H 20 (Año 2)	664	a B	-8,96E-10	a A	687	a B	-5,394	a A	0.97			

**Cuadro A3.4.**  
**(Continuación)**

SG -F H 20 (Año 1)	998	a	A	3,19E-13	a	A	1100	a	A	-9,0740	a	B	0.98
SG -F H 20 (Año 2)	986	a	A	3,47E-13	a	A	1146	a	A	-9,4971	a	B	0.99
SG C H 22 (Año 1)	694	a	B	1,04E-06	a	A	577	a	B	-3,3810	a	A	0.92
SG C H 22 (Año 2)	692	a	B	1,09E-06	a	A	613	a	B	-3,5980	a	A	0.89
SG -F H 22 (Año 1)	846	a	A	-7,60E-13	a	A	1001	a	A	-3,4250	a	A	0.91
SG -F H 22 (Año 2)	831	a	A	-8,33E-13	a	A	1035	a	A	-3,6954	a	A	0.98
SG C H 24 (Año 1)	806	a	B	-4,93E-09	a	A	547	a	B	-5,1860	a	A	0.96
SG C H 24 (Año 2)	833	a	B	-5,41E-09	a	A	566	a	B	-5,5954	a	A	0.98
SG -F H 24 (Año 1)	1028	a	A	-1,44E-10	a	A	1024	a	A	-11,2200	a	B	0.97
SG -F H 24 (Año 2)	997	a	A	-1,51E-10	a	A	1038	a	A	-11,9401	a	B	0.99
SG C H 27 (Año 1)	869	a	B	6,58E-10	a	A	660	a	B	-4,8570	a	A	0.98
SG C H 27 (Año 2)	844	a	B	6,90E-10	a	A	688	a	B	-5,0236	a	A	0.96
SG -F H 27 (Año 1)	937	a	A	6,55E-11	a	A	1014	a	A	-4,9590	a	A	0.86
SG -F H 27 (Año 2)	958	a	A	6,87E-11	a	A	1028	a	A	-5,2773	a	A	0.93



**Fig. A.3.1.** Diagrama de un tubo minirhizotron instalado debajo de una hilera (adaptado de Lisanti et al. 2013).